

Wyciszanie nadekspresji genu *MDR1* za pomocą siRNA: nośniki, efekty, perspektywy

Olga Potapińska, Maria Wąsik

*W artykule szczegółowo opisano mechanizm interferencji RNA. Przedstawiono także sposoby syntezy i transfekcji siRNA do komórek. Główną uwagę skupiono na problemie lekooporności komórek nowotworowych oraz podsumowano obecny stan wiedzy na temat wyciszania ekspresji genu *MDR1*, odpowiedzialnego za oporność wielolekową.*

Silencing of *MDR1* gene overexpression with siRNA: carriers, results, perspectives

*The paper presents a detailed description of the mechanisms of RNA interference, siRNA synthesis methods and the ways of its transfection to the cells. The authors show the problems of multidrug resistance in cancer cells and summarize present-day knowledge concerning *MDR1* gene silencing, which is responsible for multidrug resistance.*

Słowa kluczowe: siRNA, interferencja RNA, *MDR1*, glikoproteina P, transfekcja

Key words: siRNA, RNA interference, *MDR1*, P-glycoprotein, transfection

Wstęp

Podłożem wielu chorób jest nadekspresja genów kodujących białka niezbędne w prawidłowym funkcjonowaniu komórki. Sytuacja taka ma również miejsce w komórkach nowotworowych. Produktem tych genów mogą być białka pobudzające wzrost i niekontrolowany rozwój komórek, hamujące apoptozę lub utrudniające efektywną chemioterapię. Często obserwowany brak skuteczności leczenia napromieniowaniem lub chemioterapeutykami wymusza szukanie innych sposobów, które efektywnie mogłyby pokonać raka. Po przełomowym odkryciu, uhonorowanym Nagrodą Nobla w 2006 r., małych interferujących cząstek RNA (siRNA – *small interfering RNA*), pojawia się nadzieja na wykorzystanie ich własności w terapii genowej chorób nowotworowych.

Interferencja RNA

Mechanizm interferencji RNA odkryto u nicienia *Caenorhabditis elegans* jako odpowiedź na egzogenne RNA. Wprowadzenie do komórki długiego dwuniciowego RNA hamuje ekspresję genu o sekwencji homologicznej do wprowadzanego kwasu nukleinowego. Intensywne badania pozwoliły na dokładne poznanie tego mechanizmu [1].

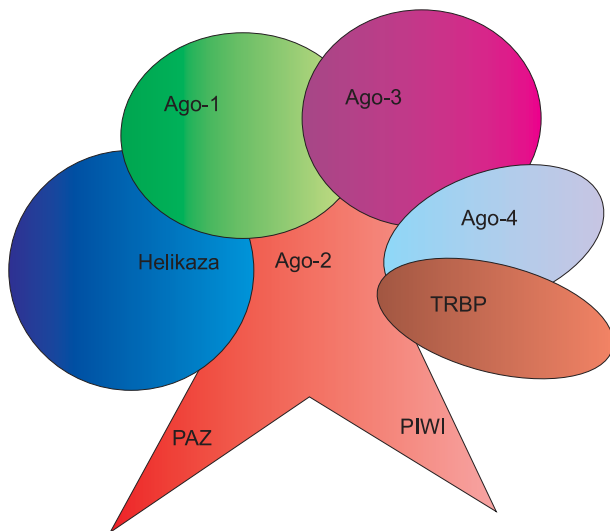
Długie dwuniciowe dsRNA (*double-strand RNA*) po wprowadzeniu do komórki zostaje enzymatycznie pocięte

do siRNA – cząsteczki zawierającej około 22 par zasad. Zaobserwowany proces pozwolił badaczom wnioskować, że powstanie siRNA jest ewolucyjną strategią ochronną komórek przed wirusami, gdyż większość znanych wirusów na pewnym etapie swojego cyklu życiowego produkuje długie dsRNA [2]. Enzymem, który przecina dsRNA, jest RNAza III, określana jako Dicer. Jej obecność wykazano w komórkach roślin, nicieni, owadów i kręgowców, co przemawia za tym, że mechanizm interferencji RNA występuje w przyrodzie powszechnie, od najwcześniejszych etapów ewolucji. U ludzi wykazano obecność tylko jednego genu dla Dicer, natomiast u *Drosophila* udowodniono ekspresję licznych genów dla tych białek, tworzących różne rodzaje siRNA [2].

Wygenerowany przez Dicer dwuniciowy siRNA na końcach 3' posiada dwa wolne nukleotydy. Końce 5' obu nici są ufosforylowane, a na końcach 3' występują reszty hydroksylowe [1].

Uzyskany siRNA związany z białkiem Dicer, wprowadzany jest do wielobiałkowego kompleksu RISC (*RNA – induced silencing complex*, kompleks wyciszający indukowany RNA) [3]. Uważa się, że w tym procesie kluczową rolę odgrywa Dicer. Wykazano, że w komórkach nie zawierających Dicer, mimo obecności siRNA, nie dochodzi do wyciszania genów [4].

Kompleks RISC zlokalizowano w cytoplazmie komórki [3]. Nieaktywny RISC składa się z podwójnej nici siRNA (przy czym tylko nić antysensowna wiąże się z białkami kompleksu), helikazy, białek rodziny Agronaut (Ago) i TRBP (*The double strand RNA-binding protein* – białko wiążące dwuniciowe RNA) (Ryc. 1). Sekwen-



Ryc. 1. Wielobiałkowy kompleks RISC bierze udział w endonukleazowym trawieniu docelowego mRNA, wykorzystując enzymatyczne właściwości białka Ago-2. Nieaktywny RISC składa się z helikazy, białek rodziny Agronaut (Ago) i TRBP (*The double strand RNA-binding protein* – białko wiążące dwuniciowe RNA)

cja i struktura siRNA determinuje, która z nici zostanie wbudowana do kompleksu RISC [4]. Aktywna forma RISC zawiera pojedynczą nić siRNA, uzyskaną dzięki endonukleazowej aktywności białka Ago-2 [5]. Sensowna nić siRNA, po oddzieleniu od nici antysensownej, oddysocjuje od kompleksu i ulega degradacji na drodze enzymatycznej.

Kluczową rolę w mechanizmie interferencji RNA odgrywa białko Ago-2, należące do rodziny białek Agronaut. U ludzi zidentyfikowano 8 białek Ago, ale tylko 3 z nich (Ago 1-3) zostały dotychczas scharakteryzowane. Białko Ago-2 w RISC ssaków jest endonukleazą. Spośród różnych Ago tylko Ago-2 posiada funkcje katalityczne. Dowiedziono, że komórki nie posiadające Ago-2 nie wykazują zjawiska interferencji RNA (RNAi) [5]. Ago-2 zawiera dwie strukturalne domeny PAZ (Piwi-Agronaut-Zwille) i Piwi. Uważa się, że białka Ago przy pomocy domeny PAZ pośredniczą w transferze siRNA z Dicer do RISC. Domena PAZ składa się z około 130 aminokwasów i zlokalizowana jest w środku białka [1]. PAZ ma zdolność wiązania siRNA [3]. Natomiast domena Piwi posiada strukturalne właściwości RNazy H, endonukleazy rozcinającej heterodupleksy DNA-RNA z DNA jako nicią antysensowną, co wykazano w badaniach krytalograficznych trójwymiarowej struktury Ago-2 [5]. C-końcowa domena Piwi zawiera około 300 aminokwasów i charakteryzuje się wysoce konserwatywną budową. To właśnie domena Piwi odgrywa najważniejszą rolę w interakcjach z Dicer [1] i z nią związana jest aktywność katalityczna kompleksu [3].

Białka wchodzące w skład aktywnego kompleksu RISC kierują nić siRNA do homologicznej sekwencji docelowego mRNA. Celem działania RISC jest ułożenie obok siebie jednostek katalitycznych Ago-2 i wrażliwego na pęknięcie (endonukleazowe trawienie) wiązania fosforanowego w docelowym mRNA [5]. SiRNA, wchodzący

w skład RISC, wiąże się z docelowym mRNA w miejscu komplementarnym do swojej sekwencji, a białko Ago-2 rozcina związane mRNA w ściśle określonym miejscu [5]. Każdy aktywny RISC, zdolny do wywołania pęknięcia mRNA, może ciąć go tylko w jednym krytycznym miejscu [4]. Do rozcięcia nie jest wymagana obecność ATP, wymagana jest natomiast obecność jonów magnezu, stabilizujących strukturę trzeciorzędową Ago-2 [5] i obecność hydrolaz do budowy końców fosforanowego 5' i hydroksylowego 3' degradowanego mRNA [2].

Interakcja Ago-2 i siRNA stabilizuje wchodzące w skład RISC małe interferujące RNA, w szczególności nukleotydy 2-5. Ago-2 tak umieszcza strukturę startową siRNA, aby związała mRNA nukleotydami 6-8 [5]. Pęknięcie mRNA pojawia się w miejscu wiązania, odpowiadającym wiązaniu między 10 a 11 nukleotydem od końca 5' antysensownej nici rozwiniętej cząsteczki siRNA [6]. W tym procesie kluczową rolę odgrywa koniec 5' siRNA. Wykazano, że podstawienie na koniec 5' grupy odpornej na fosforylację lub metylacja tego końca uniemożliwia pęknięcie mRNA. To właśnie koniec 5' determinuje pozycję krytycznego pęknięcia w mRNA. Zmiany na końcu 3' mRNA nie mają w tym procesie znaczenia.

Rolą końca 3' jest orientacja RISC i stabilizacja formy α , nowo uformowanej helisy, powstałej z nici antysensownej siRNA i docelowego mRNA [5].

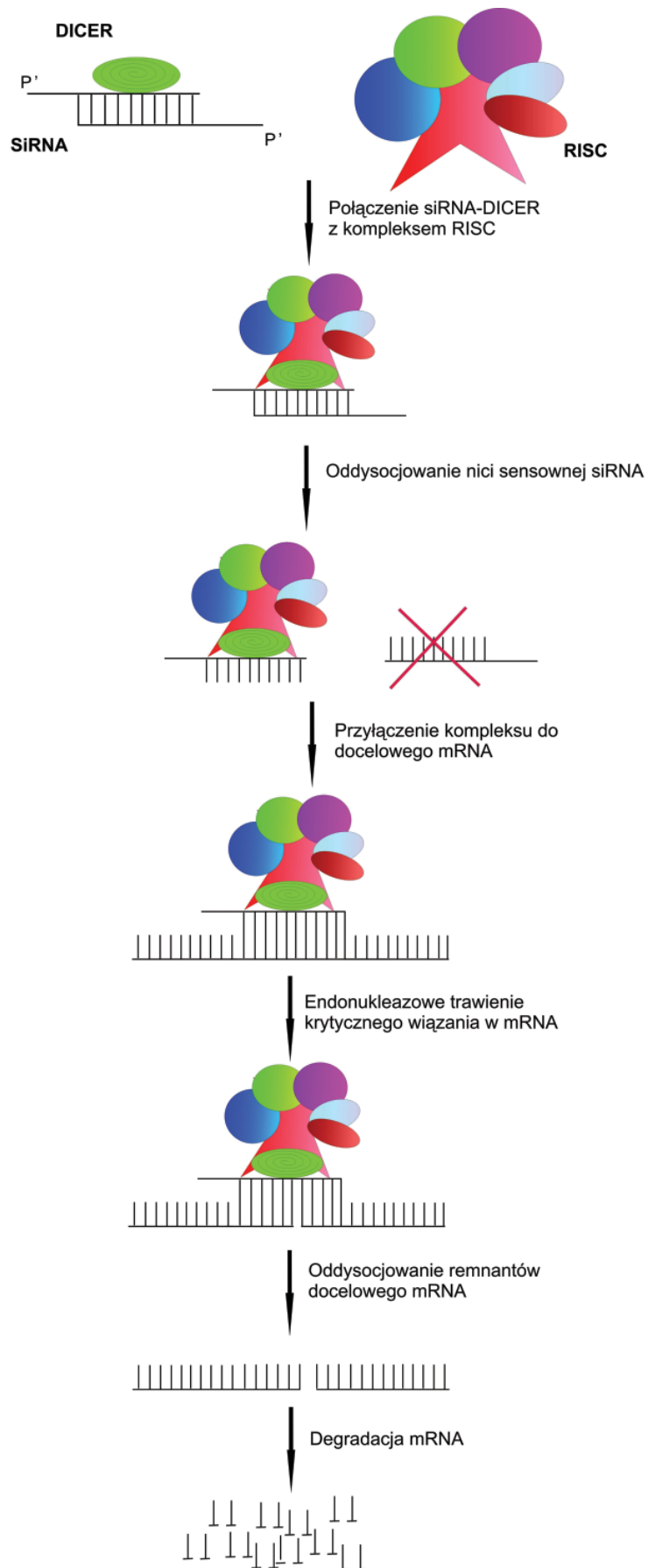
Nić antysensowna siRNA jest chroniona przed degradacją i nie jest wymieniana z wolnymi siRNA. RISC z pojedynczą nicią siRNA, po degradacji docelowego mRNA, oddysocjuje, by znaleźć kolejny cel. Samo białko Ago-2 nie jest w stanie oddysocjować od mRNA, stąd wniosek że białka wchodzące w skład kompleksu RISC są niezbędne do właściwego funkcjonowania omawianego kompleksu [5].

Co się dzieje z mRNA po przecięciu w krytycznych miejscach? Z powodu utraty czapeczki 7-metyloguaninowej na końcu 5' i ogona poli-A na końcu 3' strawione docelowe mRNA nie jest dłużej chronione przed aktywnością endogennych RNaz i może zostać zdegradowane [6] (Ryc. 2).

Białka kompleksu RISC znaleziono również w połączeniu z białkami rybosomalnymi, co sugeruje, że interferencja RNA może również zaburzać syntezę białka na etapie translacji [7]. Wykazano, że siRNA, poza degradacją mRNA, powoduje inicjację regresji translacji [8].

Synteza siRNA

Odkrycie zjawiska interferencji RNA wzbudziło nadzieje na zastosowanie tego mechanizmu do wyciszania genów odpowiedzialnych za rozwój wielu chorób. Okazało się jednak, że podawanie organizmom dsRNA o długości powyżej 30 nukleotydów powodowało nieswoistą degradację mRNA i towarzyszącą temu indukcję syntezy interferonu, podobnie jak w odpowiedzi na RNA wirusów [3, 6]. Podjęto więc próby syntezy siRNA, o odpowiedniej długości i sekwencji komplementarnej do docelowego mRNA, które nie wywoływałyby nieswoistych efektów.



Rys. 2. Wprowadzenie siRNA do wielobiałkowego kompleksu RISC powoduje rozwinięcie nici, połączenie nici antysensownej z docelowym mRNA i degradację mRNA dla genu homologicznego do struktury wprowadzonego siRNA. Po zejściu reakcji remnanty mRNA oddysocjują, pozostawiając aktywny kompleks RISC, gotowy do degradacji kolejnych cząsteczek

Wyznaczono wiele kryteriów, jakie musi spełniać krótkie interferujące RNA. Przede wszystkim, przy syntezie takiego swoistego dwuniciowego fragmentu kwasu nukleinowego, należy uwzględnić, że to nić antysensowna wchodzi w skład aktywnego RISC i to jej sekwencja nukleotydowa musi być komplementarna do docelowego mRNA [5].

Gong i wsp. ustalili algorytm postępowania przy projektowaniu siRNA, którego przestrzeganie zdecydowanie poprawia wydajność uzyskiwanego produktu. Proponują oni siedem kryteriów, jakie powinna spełniać cząsteczka siRNA (Tab. I). Wykazano, że 93% zsyntetyzowanych zgodnie z tym algorytmem siRNA wykazywało skuteczność wyciszania na poziomie powyżej 80%, a pozostałe siRNA, wyprodukowane według powyższego algorytmu, wykazywały skuteczność wyciszania powyżej 50% [9].

Tab. I. Algorytm syntezy efektywnych siRNA wg Gong i wsp. [9]

Kryteria syntezy efektywnego w działaniu siRNA	
1.	30-50% par GC
2.	Jak najwyższa liczba wiązań AU w pozycjach 12-15
3.	Jak najniższa temperatura topnienia konstruktów
4.	Zawartość konkretnego nukleotydu w pozycji 3
5.	Zawartość konkretnego nukleotydu w pozycji 10
6.	Zawartość konkretnego nukleotydu w pozycji 13
7.	Zawartość konkretnego nukleotydu w pozycji 19

Metody syntezy siRNA są różnorodne. Obecnie są stosowane:

- synteza chemiczna;
- synteza *in vitro* przy użyciu metody PCR lub tradycyjnego klonowania na matrycy wektora, pod kontrolą promotora U6 lub H1RNA polimerazy III lub promotora polimerazy II CMV;
- użycie rekombinowanego sklonowanego białka Dicer, który będzie produkował fragmenty dsRNA, komplementarne do docelowego mRNA [3].

Wybór metody w każdym przypadku zależy od badacza, należy jednak zaznaczyć, że synteza na drodze PCR jest najmniej czasochłonna, nie pozwala jednak na wyznaczenie produktu znacznikiem fluorescencyjnym, co jest przydatne w wizualizowaniu rozmieszczenia siRNA w komórce czy tkance. Najbardziej czasochłonna i dość kosztowna jest synteza chemiczna. Pozwala ona natomiast na fluorescencyjne wyznaczenie produktu. Użycie sklonowanego białka Dicer pozwala na uzyskanie w stosunkowo krótkim czasie wysoce swoistego siRNA, którego sekwencja nie musi być kontrolowana po procesie syntezy i, co warto odnotować, jest zdecydowanie najtańsza [10].

Wprowadzanie siRNA do komórki

Aby wywołać aktywność wyciszającą siRNA, należy dostarczyć go do cytoplazmy komórki docelowej. W tym celu bada się wiele systemów ewentualnej transfekcji, w tym bardzo popularne w inżynierii genetycznej wektory wirusowe oraz modyfikacje chemiczne siRNA.

Istnieje wiele skutecznych i udokumentowanych metod transfekcji siRNA. Pierwszą z nich jest wprowadzenie małych interferujących RNA przy pomocy wektorów wirusowych. Obecnie stosuje się 5 rodzajów wektorów wirusowych: adenowirusy, retrowirusy, lentiwirusy, wirusy towarzyszące adenowirusom (AAV – *Adeno-associated Virus*) oraz baculowirusy [11, 12].

Do transfekcji siRNA stosuje się również kilka innych, niezależnych od wirusów systemów, takich jak: iniekcja niemodyfikowanego siRNA, wprowadzanie stabilizowanego lub modyfikowanego chemicznie siRNA, wprowadzanie siRNA zamkniętych w mikrocząsteczkach lub liposomach oraz łączenie siRNA ze związkami kationowymi [11, 13-15].

Ostatnio podjęto próby wyciszania genów w komórkach, stosując niepatogenne bakterie jako nośniki siRNA. Bakterie wykazują wiele zalet w porównaniu z innymi stosowanymi systemami transfekcji, dlatego rozważane są możliwości ich zastosowania w terapii genowej [11].

Problem terapii przeciwnowotworowej – oporność wielolekowa

Oporność wielolekowa (MDR – *multidrug resistance*) jest zdefiniowana jako oporność komórek nowotworowych na stosowane w chemioterapii cytostatyki i związki cytotoksyczne, o różnicowanej budowie i funkcji [16]. Głównym białkiem odpowiedzialnym za zjawisko MDR jest glikoproteina P (Gp-P), kodowana przez gen *MDR1*, należąca do grupy genów MDR. *MDR1* znajduje się na długim ramieniu chromosomu 7 (7q21.1), a jego lokalizację ustalili w 1987 r. Calen i wsp. W wyniku transkrypcji *MDR1* powstaje mRNA o długości 4872 zasad [17]. Glikoproteina P występuje naturalnie w większości tkanek ustroju i pełni ważne fizjologiczne funkcje. Gp-P wykazuje aktywność ATP-azy, zależnej od fosfolipidów, stymulowanej lub hamowanej przez różne ksenobiotyki. Najwyższy poziom ekspresji genu *MDR1* oraz aktywności glikoproteiny P wykazano w takich organach, jak kora nadnerczy, nerki, wątroba, jelito grube, jelito cienkie oraz trzustka. Taka lokalizacja sugeruje udział Gp-P w usuwaniu produktów przemiany materii i toksyn z wnętrza komórek, co chroni organizm przed ich szkodliwym wpływem [18]. Pełni ona również funkcję transportera błonowego dla leków, toksyn i substancji endogennych. Usuwając chemioterapeutyki, czyni komórki ze wzmoczoną ekspresją genu *MDR1* opornymi na leczenie [19]. Jedną z cech komórek nowotworowych jest właśnie podwyższona ekspresja *MDR1*, a dotychczasowe próby zahamowania tej ekspresji nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. Obiecującą technologią może być zastosowanie interferencji RNA w celu degradacji mRNA dla Gp-P.

Wyciszanie ekspresji glikoproteiny P przy pomocy siRNA

Konsekwencją wyciszenia genu oporności wielolekowej (*MDR1*) *in vivo* mogłoby być zahamowanie wyrzucania chemioterapeutyków z wnętrza komórek nowotworowych i zwiększenie efektywności leczenia. Aby rozpocząć stosowanie terapii genowej *in vivo* w tej formie, należy najpierw uzyskać korzystne wyniki w badaniach na hodowlach komórkowych.

W badaniach *in vitro* używanych jest wiele linii komórkowych z nadekspresją genu oporności wielolekowej. Stosuje się komórki linii mysich fibroblastów NIH 3T3-MD [13], komórki linii KB-3-1 ludzkiego nowotworu naskórka i linii KB-8-5 [20, 21], komórki linii ludzkiego raka okrężnicy HCT-8, linię ludzkich komórek embrionalnych nerki HEK293 [22], komórki raka sutka

linii MCF-F/Adr i MCF-7/BC-19 [23, 24], komórki raka wątrobowokomórkowego linii HEPG2 [25], raka jajnika z linii SKOV 3 i ich podtypu opornego na paclitaxel SKOV 3/TR [26], linię komórek raka sutka bez ekspresji genu *MDR1* MCF-7 [26], komórki linii raka żołądka EPG85-257P i raka trzustki EPP85-181P [27], komórki raka piersi linii NCI/ADR-RES oraz linię komórek raka jamy ustnej KB-C1 [12].

Każda z tych linii komórkowych charakteryzuje się innym poziomem ekspresji genu oporności wielolekowej oraz inną drogą jej nabycia (naturalna lub transferowana). Stosując interferencję RNA wykazano, że za pomocą siRNA może być wyciszona ekspresja zarówno endogennego, jak i transferowanego genu *MDR1*, co przywraca wrażliwość tych komórek na leki transportowane przez PgP [23]. siRNA stosowane do wyciszenia genów może być poddane wielu modyfikacjom. Pozwala

Tab. II. Sposoby transfekcji siRNA do komórek – ich wady i zalety [11]

Metoda transfekcji	Zalety	Wady
Retrowirusy	Pierwsze wektory stosowane w terapii genowej, duża dostępność	ryzyko rozwoju choroby o podłożu wirusowym, niska wydajność, działanie tylko w komórkach dzielących się
Adenowirusy	Materiał niesiony do komórki kierowany jest preferencyjnie do cytoplazmy	nie wykazuje specyficznego tropizmu tkankowego, wykazuje zależność transfekcji od antygenów powierzchniowych na docelowych komórkach, duża toksyczność względem wątroby i konieczność limitowania dawki
Lentiwirusy	Nie wykazują właściwości mutagennych, mogą skutecznie działać w obrębie komórek dzielących się, jak i będących w stanie spoczynkowym, dają możliwość umieszczenia w nich dużej ilości materiału genetycznego, są mniej immunogenne od wektorów adenowirusowych	Podklasa retrowirusów
AAV	wirus niepatogenny, wykazuje szeroki zakres transfekcji również do komórek nie dzielących się, szeroki tropizm tkankowy, jego zastosowanie nie wiąże się z ryzykiem efektów immunopatogennych	Mało przebadany
Baculowirusy	zdolność do przenoszenia dużej ilości materiału genetycznego, brak zdolności replikowania w komórkach ssaków	Mało przebadany
Nagi siRNA i metoda hydrodynamiczna	doskonała metoda do zastosowania u myszy z relatywnie niewielką liczbą efektów ubocznych	u ludzi użycie tej metody jest raczej nierealne, gdyż wiązałoby się to z użyciem ogromnej objętości (kilku litrów) roztworu z siRNA
Modyfikacje chemiczne	LNA (<i>locked nucleic acid</i>) podnoszą stabilność oligonukleotydów, integracja LNA może mieć korzystny wpływ na integrację umiarkowanie tylko aktywnych siRNA do kompleksu RISC, podnosząc ich aktywność	Modyfikacja w trakcie badań
	Tiofosforany wydłużają czas półtrwania oligonukleotydów <i>in vivo</i>	Modyfikacja w trakcie badań
	Modyfikacja ANA – altrial wprowadzony w miejsce pierścienia rybozy daje odporność na degradację enzymatyczną	Modyfikacja w trakcie badań
Liposomy i nanocząsteczki	Odporność na degradację enzymatyczną, łatwość penetrowania błon komórkowych	Modyfikacja w trakcie badań
Transfekcja celowana	Preferencyjne osiągnięcie określonych komórek przez zastosowanie swoistych ligandów dla antygenów powierzchniowych komórek	Konieczność znalezienia specyficznych antygenów (ligandów do związania)
tkRNAi – Interferencja Między Królestwami	zdolność do kontrolowania wektora (bakterii) przy użyciu antybiotyków, znany profil oporności antybiotykowej potencjalnych wektorów, bakterie łatwo można poddawać procesom inżynierii genetycznej, co stwarza możliwość stworzenia wysoce specyficznych, „szytych na miarę”, nici RNA na tych wektorach	Na wczesnym etapie badań

to na wybranie najbardziej swoistej i efektywnej struktury tego kwasu nukleinowego. W próbach wyciszania genu wykorzystano między innymi siRNA w modyfikacji ANA. Było to pierwsze zastosowanie ANA w próbach biologicznych. Największe efekty wyciszające zaobserwowano przy zastosowaniu siRNA z modyfikacjami na końcach obu nici. Zaobserwowano wówczas ponad dwukrotnie obniżenie ID-50 dla dokсорubicyny (ID50 – stężenie związku powodujące śmierć 50% komórek) oraz redukcję ekspresji PgP o 50–75%. Redukcję ilości mRNA dla *MDR1* zaobserwowano równolegle z redukcją ekspresji produktu białkowego, co sugeruje, że siRNA z modyfikacją ANA działa na poziomie transkrypcji. Badano również stabilność siRNA w obecności nukleaz, jednak nie wykazano, aby modyfikacja ANA wpływała na jej poprawę [13]. Wprowadzenie modyfikacji chemicznych może podwyższać odporność siRNA na trawienie nukleazowe i wydłużać czas jego biologicznej aktywności. Wykazano, że ochrona końca 3' siRNA przez odwrócone wiązanie 3'-3' i wprowadzenie dwóch jednostek O-metylenowych na końcu 3' zdecydowanie podwyższa aktywność biologiczną siRNA i czas jego działania, co pozwala osiągnąć trzydziestokrotne zwiększenie stężenia cytostatyku we wnętrzu komórki i w konsekwencji jej śmierć [20, 21].

Wydatność wyciszania genu przez małe interferujące siRNA wydaje się być zależna od regionu mRNA, przeciwko któremu skierowane jest siRNA. Wykazano, że oligonukleotydy komplementarne do regionu kodującego i regionu AUG genu *MDR1*, obniżają poziom ekspresji mRNA dla *MDR1* w komórkach KB-8-5 odpowiednio o 90% i 40%. Zastosowano również siRNA skierowane przeciwko fragmentowi mRNA z nukleotydami 598-618 dla *MDR1*. Traktowanie komórek KB-8-5 taką strukturą wydajnie blokowało wypompowywanie rodaminę 123 z komórek i odwracało fenotyp MDR [20, 21]. SiRNA skierowany przeciwko nukleotydom 508-528 był bardziej wydajny niż ten skierowany przeciwko nukleotydom 503-523. Najbardziej efektywny był siRNA skierowany przeciwko nukleotydom 88-110 i 2900-2922 [22]. siRNA skierowano również przeciwko nukleotydom 79-99 po kodonie startowym. Zwiększenie akumulacji leków w komórkach traktowanych siRNA było statystycznie istotnie wyższe od stężenia w komórkach nie poddanych transfekcji [23]. W innym eksperymencie zsyntetyzowano dwie struktury siRNA: siRNA1, skierowany był przeciwko nukleotydom 88-108, natomiast siRNA2 przeciwko nukleotydom 162-182. Wykazano, że siRNA1 był wydajniejszy niż siRNA2 [24].

Skuteczność wyciszania genów może być również zależna od sposobu transfekcji kwasu nukleinowego. Wśród opisywanych doniesień najczęściej stosowana była transfekcja siRNA, przeprowadzona przy pomocy Lipofectamine 2000 [13, 24, 25] i Oligofectamine [20, 21, 23, 26, 27]. Wykorzystano również transfekcję przy pomocy wektora – adenowirusów [12].

Obecnie postuluje się, że długoterminowe hamowanie ekspresji PgP może być osiągnięte, jeżeli wektor siRNA będzie miał zdolność przetrwania w komórkach [12]. Jednocześnie udowodniono, że wyciszanie przy

pomocy wektorowo dostarczanego siRNA jest mniej wydajne niż przy transfekcji syntetycznych kwasów nukleinowych, ponieważ liczba cząsteczek siRNA zdolnych do związania z wirusem jest stosunkowo niewielka [26].

Oceny skuteczności działania siRNA dokonywano przy pomocy analizy Western blot (ocena stężenia białka) [23, 24] i testem MTT, tzn. wyznaczaniem czułości komórek na chemioterapeutyk: winblastynę [20, 21], dokсорubicynę [13, 22], winkrystynę [22], paclitaxel [22, 26], adriamycynę [25]. Wykazano obniżenie ID50 dla dokсорubicyny z 50 μM do 1,5–2,5 μM . [12]. Ekspresję powierzchniowego PgP oceniano przy pomocy cytometrii przepływowej [12, 13, 20, 21, 24], a czynność białka oceniano przez akumulację barwnika fluorescencyjnego – rodaminę 123 w badanych komórkach [19, 25]. Ocenę hamowania ekspresji *MDR1* przez oznaczenie poziomu mRNA wykonywano przy pomocy RT-PCR [23, 24].

Porównywano również czas redukcji lekooporności przy zastosowaniu tradycyjnych i modyfikowanych siRNA. Przy zastosowaniu konwencjonalnego siRNA efekt wyciszenia obserwowano do 4. dnia po transfekcji. Zanikał on już w 6. dniu, a poziom mRNA dla PgP wracał do poziomu wyjściowego [13]. Natomiast zmodyfikowane przez ANA na obu końcach siRNA wykazały utrzymujący się efekt wyciszenia genu do 6. dnia i zanik efektu dopiero po 8. dniu od transfekcji [13]. W badaniach zespołu Logashenko wykazano, że po pojedynczej transfekcji siRNA do komórki, poziom docelowego mRNA pozostaje obniżony przez 2–4 dni, a następnie wraca do stanu wyjściowego. Inkubacja komórek z winblastyną po 72 h od ekspozycji na siRNA nie zmniejszyła znacząco żywotności komórek, co wynika najprawdopodobniej z faktu, że czas półtrwania PgP wynosi 42–72 godzin. Jednak, kiedy komórki były inkubowane z winblastyną przez 96–120 h, to obserwowano stopień redukcji żywotności w zależności od stężenia użytego siRNA [20, 21]. W komórkach raka trzustki działanie siRNA było wyraźniejsze niż w komórkach raka żołądka [27]. W badaniach, w których wykorzystano adenowirusy do transfekcji siRNA do komórek raka piersi linii NCI/ADR-RES i komórek linii KB-C1 raka jamy ustnej, uzyskano silne obniżenie ekspresji *MDR1*. Komórki badanych linii zainfekowano 1200 cząsteczkami wirusa scAAV i hodowano przez 6 i 4 dni. Inhibicja genu była zauważalna w drugim dniu po transfekcji, utrzymywała się przez kilka dni i zaczęła spadać po 7 dniach od transfekcji. Czas ten jest zdecydowanie dłuższy niż obserwowany po transfekcji chemicznie zmodyfikowanych siRNA. Komórki wykazywały powrót lekooporności dopiero po 14 dniach od transfekcji. Zaobserwowano również, że nie ulega zmianie ekspresja genu *MDR2*, blisko spokrewnionego z *MDR1*, co świadczy o wysokiej swoistości struktury siRNA [12]. W badaniach *in vivo* dostarczano siRNA przeciwko MDR-Fluc, który wykazuje ekspresję w wątrobie i udowodniono skuteczność terapii celowanej. siRNA dostarczane metodą hydrodynamiczną znajdowane było właśnie w narządzie docelowym [22].

W żadnej z opublikowanych prac nie doniesiono o całkowitym wyciszeniu oporności wielolekowej. Brak

całkowitego wyciszenia jest najprawdopodobniej wynikiem wysokiej ekspresji MDR1 w badanych komórkach, stosunkowo długiego okresu półtrwania PgP oraz zmiennej, zależnej od wielu czynników, wydajności transfekcji [23].

Podsumowanie

Doniesienia dotyczące skutecznego zastosowania siRNA do wyciszenia genu oporności wielolekowej są bardzo obiecujące i pozwalają mieć nadzieję na zastosowanie tej metody w próbach klinicznych. Jednak należy pamiętać o fizjologicznie wysokim poziomie ekspresji PgP w komórkach nabłonkowych i wielu innych [27]. Obecnie próby zastosowania siRNA powinny być ukierunkowane na znalezienie metody absolutnie swoistego wprowadzania małych interferujących RNA do komórek. W tym celu najpierw trzeba doskonale poznać „wroga”, z którym chcemy walczyć. Przecież skierowanie siRNA przeciwko komórkom wykazującym silną ekspresję integryny nie da gwarancji, że cząsteczki te sięgną tylko komórek guzów litych. Podobnie z markerami powierzchniowymi w komórkach białaczkowych: charakterystyczny związek antygenów CD10CD19 na komórkach cALL-B mógłby być celem omawianej terapii genowej, ale... te antygeny występują rozłącznie również na zdrowych komórkach krwi obwodowej i szpiku. Zanim podejmie się próby kliniczne zastosowania siRNA do wyciszenia oporności wielolekowej, trzeba porównać i zdecydować, czy zalety tej metody przewyższają będą jej wady. Bo co nam da zniszczenie tą metodą komórek nowotworowych, jeżeli jednocześnie osłabi się ochronne działanie PgP w barierze krew-mózg, w nadnerczach, nerkach, czy jelitach i spowoduje się martwicę newralgicznych dla funkcjonowania organizmu organów?

Mgr Olga Potapińska
ul. Marszałkowska 24
00-576 Warszawa
e-mail: olga.potapinska@wum.edu.pl

8. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon G i wsp. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006; 20: 515-24.
9. Gong D, Ferrel Jr JE. Picking a winner: new mechanistic insights into design of effective siRNAs. *Trends in biotechnology* 2004; 22: 451-54.
10. „Five ways to Produce siRNA”. Ambion TechNotes 10 (3), www.ambion.com/RNAi
11. Li CX, Parker A, Menocal E i wsp. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle* 2006; 5: 2103-9.
12. Xu D, McCarty D, Fernandes A i wsp. Delivery of MDR1 small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Ther* 2005; 11: 523-30.
13. Fisher M, Abramov M, van Aerschot A i wsp. Inhibition of MDR1 expression with altrial-modified siRNAs. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 1064-74.
14. Schifferers RM, Ansari A, Xu J i wsp. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e49.
15. Vornlocher HP. Antibody-directed cell-type-specific delivery of siRNA. *Trends Mol Med* 2006; 12: 1-3.
16. Liscovitsch M, Lavie Y. Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *IDrugs* 2002; 5: 349-55.
17. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *The AAPS Journal* 2005; 7: E1-5.
18. Alexandrova R. Multidrug resistance and P-Glycoprotein. *Experimental Pathology and Parasitology* 1998; 1: 62-6.
19. Limtrakul P, Anuchapreeda S, Buddhasukh D. Modulation of human multidrug-resistance MDR1 gene by natural curcuminoids. *BMC Cancer* 2004; 17: 4-13.
20. Logashenko EB, Vladimirova AV, Volkov AA i wsp. Suppression of MDR1 gene expression by chemically modified siRNAs. *Russ Chem Bull International Edition* 2006; 55: 1275-83.
21. Logashenko EB, Vladimirova AV, Zenkov AN i wsp. Reversion of the multiple-drug resistance phenotype mediated by short interfering RNAs. *Russ Chem Bull International Edition* 2004; 54: 1298-305.
22. Pichler A, Zelcer N, Prior JL i wsp. In vivo RNA interference – mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4487-97.
23. Wu H, Hait WN, Yang J-M. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-Glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1515-19.
24. Stierle V, Laigle A, Jolles B. Modulation of MDR1 gene expression in multidrug resistant MCF7 cells by low concentration of small interfering RNAs. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1424-30.
25. Chen X-P, Wang Q, Guan J i wsp. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells. *World J of Gastroenterol* 2006; 12: 3332-7.
26. Duan Z, Brakora KA, Seiden MV. Inhibition of AbCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 833-8.
27. Nieth C, Priebisch A, Stege A i wsp. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotyp by RNA interference (RNAi). *FEBS Letters* 2003; 545: 144-50.

Otrzymano: 14 stycznia 2008 r.
Przyjęto do druku: 27 marca 2008 r.

Piśmiennictwo

1. Kim VN. RNA interference in functional genomics and medicine. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 309-18.
2. Whitey JME, Crompton MR. RNA Interference: a new targeted tumour therapy?. *Current Cancer Therapy Reviews* 2005; 1: 11-7.
3. Wesołowska A. Wykorzystanie małych interferujących RNA do hamowania ekspresji genów w komórkach ssaków – zastosowanie w neurobiologii. Konferencja *Nowe metody w neurobiologii* 15.12.2004.
4. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 2005; 19: 517-29.
5. Aronin N. Target selectivity in mRNA silencing. *Gene Ther* 2006; 13: 509-16.
6. Lage H. Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. *Future Onc* 2005; 1: 103-13.
7. Majorek M, Guzenda P, Lamperska-Przybysz M i wsp. Krótkie interferujące RNA w onkologii. *Współczesna Onkologia* 2006; 10: 367-72.