

УДК 577.2

Подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* с помощью siРНК снижает скорость пролиферации клеток нейробластомы человека на длительное время

И. А. Акимов, Е. Л. Черноловская*, Ю. Е. Спицына, Е. И. Рябчикова, М. А. Зенкова
 Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
 Российской академии наук, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8
 *E-mail: elena_ch@niboch.nsc.ru
 Поступила в редакцию 15.04.2011 г.

РЕФЕРАТ Изменение экспрессии генов, продукты которых участвуют в регуляции клеточного цикла, влияет на процессы клеточной дифференцировки и апоптоза, может привести к неконтролируемой пролиферации клеток и соответственно к развитию злокачественных опухолей. В данной работе изучено влияние подавления экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК), направленных на участки мРНК генов *Her2*, циклина В1 (*CCNB1*) и протеинкиназы С (*PKC*), на пролиферацию опухолевых клеток человека различного происхождения. Максимальное подавление экспрессии генов *CCNB1*, *Her2* (в клетках KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7) и *PKC* (в клетках MCF-7) наблюдается через 72 ч после трансфекции соответствующей siРНК, а через 12 дней после трансфекции происходит полное восстановление исходного уровня экспрессии генов-мишеней. Ингибирование экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* по-разному снижает скорость пролиферации клеточных линий. Антипролиферативное действие использованных siРНК наиболее выражено в клетках нейробластомы SK-N-MC, 3–10-кратное снижение скорости пролиферации которых наблюдается даже после восстановления исходных уровней экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что гены *CCNB1* и *PKC* могут служить мишенями для разрабатываемых ген-направленных препаратов, эффективных против нейробластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА нейробластома, siРНК, *Her2*, *CCNB1*, *PKC*, пролиферация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ C – 2'-О-метилцитозин; U – 2'-О-метилуридин; siРНК (small interfering RNA) – малые интерферирующие РНК; МТТ – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолбромид; PBS – фосфатно-солевой буфер; FBS – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественная трансформация клеток – сложный процесс, включающий как генетические нарушения, так и сбой в регуляции процессов дифференцировки, апоптоза и пролиферации [1, 2]. Цепь передачи регуляторных сигналов в клетке имеет каскадный характер и состоит из многих путей, дублирующих друг друга [3]. При подавлении экспрессии одного из участвующих в передаче сигналов клеточных факторов возможна компенсация его функции за счет активации альтернативных сигнальных путей [3]. Это обстоятельство, с одной стороны, осложняет поиск адекватных молекулярных мишеней, а с другой, определяет необходимость создания противоопухолевых средств, обеспечивающих необратимый антипролиферативный эффект путем «выключения»

синтеза белковых факторов, локализованных на пересечении регуляторных путей.

Причиной неконтролируемого деления клеток при онкологических заболеваниях может быть гиперэкспрессия нормальных генов или экспрессия их мутантных вариантов, кодирующих факторы транскрипции, рецепторы, тирозинкиназы и другие регуляторные белки [2]. Подавление синтеза таких белков может дать положительный результат и нормализовать пролиферацию клеток [4–7].

В настоящее время РНК-интерференция широко используется как для изучения роли генов в регуляции клеточного цикла, так и для выявления потенциальных мишеней для создания новых терапевтических средств [8–10]. Специфичное и эффективное подавление экспрессии генов-мишеней может быть

достигнуто с помощью химически синтезированных малых интерферирующих РНК (siРНК) [11]. Продукты генов *Her2*, циклина В1 (*CCNB1*) и протеинкиназы С (*PKC*) относятся к разным группам белков, участвующих в регуляции клеточного цикла [8, 12, 13]. Ранее было показано экспериментально и подтверждено клинически, что нарушения экспрессии этих генов могут приводить к возникновению злокачественных опухолей у человека [12, 14–18]. Уровень амплификации и экспрессии этих генов в клетках рака молочной железы, яичников и других органов человека значительно выше, чем в нормальных клетках этих органов [14, 17–32]. Более того, высокие уровни экспрессии генов *Her2*, *CCNB1*, *PKC* коррелируют с плохим прогнозом: снижается 3-летняя выживаемость и продолжительность безрецидивного периода [17, 18, 22–25, 30].

Ген *Her2* (известный также, как *c-erb-B2* и *neu*) кодирует трансмембранный гликопротеин, который обладает тирозинкиназной активностью и относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста человека, играющих важную роль в контроле пролиферации, дифференцировки и подвижности эпителиальных клеток человека [33, 34]. Уровень экспрессии гена *Her2*, значительно превышающий норму, обнаружен в клетках рака молочной железы, эндометрия, шейки матки, яичников, фаллопиевых труб и легкого человека [25, 29, 30].

Циклин В1, кодируемый геном *CCNB1*, является регуляторной субъединицей комплекса циклин-зависимой киназы 1 (CDK1), контролирующего переход из фазы G₂ клеточного цикла в фазу М [35]. Гиперэкспрессия гена *CCNB1* обычно не сразу приводит к нарушению клеточного цикла, что обуславливает накопление в клетке мутаций [36]. Повышенный уровень экспрессии этого гена, характерный для добро- и злокачественных опухолей предстательной железы человека [37], часто является причиной анеуплоидии [38]. Очевидно, нарушение экспрессии гена *CCNB1* можно рассматривать как раннее событие в злокачественном перерождении клеток [17].

Протеинкиназа С, кодируемая геном *PKC*, экспрессируется во многих тканях и органах человека, она играет важную роль в передаче регуляторных сигналов, активирующих различные клеточные функции, в том числе и пролиферацию [39, 40]. Превышающий норму уровень экспрессии гена *PKC* обнаружен в человеческих раковых клетках различного происхождения [18, 19].

Известно, что подавление экспрессии одного и того же гена в опухолевых клетках различного тканевого происхождения может приводить к различному антипролиферативному эффекту [41]. Это определяет необходимость сравнения антипролиферативного дей-

ствия siРНК в разных линиях опухолевых клеток человека. Ранее мы показали, что siРНК, направленные на мРНК генов *Her2*, *CCNB1*, *PKC*, эффективно ингибируют экспрессию целевых генов и в течение 5 дней после трансфекции оказывают антипролиферативное действие на опухолевые клетки человека [41].

В настоящей работе мы оценили отдаленные последствия кратковременного подавления экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* для пролиферации и морфологии опухолевых клеток человека. Мы показали, что siРНК, гомологичные мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, подавляют экспрессию этих генов с достижением максимального эффекта (до 4–22% от уровня в контроле) через 72 ч после трансфекции. Эти siРНК с разной эффективностью замедляли деление опухолевых клеток человека различного тканевого происхождения. Мы обнаружили, что в клетках нейробластомы SK-N-MC антипролиферативный эффект siCyc и siPKC сохраняется даже после восстановления исходных уровней экспрессии генов-мишеней. Полученные данные позволяют предположить, что гены *CCNB1* и *PKC* играют ключевую роль в поддержании высокой скорости пролиферации клеток нейробластомы, а их кратковременное подавление приводит к переключению путей передачи сигналов и нормализации скорости деления клеток. Таким образом, гены *CCNB1* и *PKC* в клетках SK-N-MC могут служить потенциальными эффективными мишенями для средств, направленных против нейробластомы, включая siРНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

siРНК

Все олигорибонуклеотиды, использованные для формирования siРНК-дуплексов, синтезировали в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U («Биоссет», Россия) и выделяли с помощью высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Нуклеозочувствительные сайты siРНК защищали, вводя в siРНК 2'-О-Ме-аналоги рибонуклеотидов, с помощью алгоритма, описанного ранее [42, 43]. Чистота олигорибонуклеотидов была не менее 95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В работе использовали следующие siРНК: siHer, гомологичную участку 1297–1317 мРНК гена *Her2* человека (смысловая цепь 5'-GCAGUUACCAGUGCCAAUAAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UAUUGGCACUGGUAACUGCCC-3'); siCyc, гомологичную участку 189–209 мРНК гена *CCNB1* человека (смысловая цепь 5'-CACCAGGAACUCGAAAAUUUU-3', антисмыс-

ловая цепь 5'-AAUUUUCGAGUUCCCUGGUGAC-3'); siPKC, гомологичную участку 1079-1099 мРНК гена PKC человека (смысловая цепь 5'-GCGGCCAGAGAAGGAAAAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UUUUCCUUCUCUGGCCGCUG-3'), подчеркнуты 2'-О-Ме-модифицированные звенья. В качестве отрицательного контроля использовали siScr (смысловая цепь 5'-CAAGUCUCGUAUGUAGUGGUU-3', антисмысловая цепь 5'-CCACUACAUACGAGACUUGUU-3'), не имеющую значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями мРНК генов мыши, крысы и человека. siРНК подбирали с использованием программы BioPredSi [44]. siРНК получали путем гибридизации антисмысловой и смысловой цепей в буфере 15 мМ HEPES-КОН pH 7.4, 50 мМ ацетат калия, 1 мМ ацетат магния. Для этого эквимольную смесь олигорибонуклеотидов (смысловая и антисмысловая цепи) инкубировали в течение 2 мин при 90°C и медленно охлаждали до комнатной температуры.

Клеточные культуры и трансфекция siРНК

Линии клеток карциномы шейки матки человека KB-3-1, нейробластомы SK-N-MC и аденокарциномы молочной железы MCF-7 получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки растили в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. За сутки до опыта клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, рассеивали на 6-луночные планшеты: KB-3-1 – по 4 × 10⁴, SK-N-MC – 2 × 10⁵, MCF-7 – 8 × 10⁴ клеток/лунку, либо на 24-луночные планшеты KB-3-1 – по 10⁵, SK-N-MC – 1.25 × 10⁵ и MCF-7 – 1.5 × 10⁵ клеток/лунку и оставляли прикрепляться в течение ночи. Клетки трансфицировали siРНК в концентрации 200 нМ, используя в качестве трансфектанта Липофектамин 2000™ («Invitrogen», США), а для клеток SK-N-MC – Олигофектамин™ («Invitrogen», США) в соответствии с протоколом производителя. Уровни специфических мРНК определяли через 1–5, 7, 10 и 12 сут после трансфекции. Клетки, обработанные только трансфицирующим агентом или комплексом siScr/липофектамин (олигофектамин), служили контролем. В процессе опыта клетки пересевали раз в 3–4 дня для поддержания экспоненциального роста.

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР)

Суммарную РНК выделяли из клеток, используя SDS-фенольный метод [45]. Реакцию обратной транс-

крипции (ОТ) проводили в смеси объемом 20 мкл, содержащей 1 мкг суммарной РНК, 5 мкМ олиго(dT₁₅)-праймера, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 75 мМ КCl, 3 мМ MgCl₂, 0.5 мМ dNTP, 5 мМ дитиотреитола и 10 ед. акт. обратной транскриптазы MMLV (вирус лейкоза мышей Молони). Реакционную смесь инкубировали при 42°C в течение 1 ч. Полученную кДНК амплифицировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1 мкл кДНК, 10 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 50 мМ КCl, 1.5 мМ MgCl₂, 0.01% Твин-20, по 0.25 мМ каждого dNTP, по 0.25 мкМ каждого праймера, 0.5 мМ EvaGreen («Biotium», США) и 2 ед. акт. термостабильной ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (производство ИХБФМ СО РАН). ПЦР в реальном времени проводили на приборе Bio-Rad iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System по следующей схеме: один цикл – 3 мин, 95°C, 40 циклов – 30 с, 95°C, 30 с – 58°C, 30 с – 72°C. Количество мРНК каждого гена нормировали на количество мРНК β-актина, поскольку уровень экспрессии этого гена относительно постоянный в клетках различного типа. Относительный уровень экспрессии генов определяли с помощью программы Bio-Rad iQ5 2.0 («Bio-Rad Laboratories Inc.», США).

В работе использовали следующие ДНК-праймеры:

Her2 прямой – 5'-AGCAATGGTGTCTCAGTATCCAGGCT-3',

Her2 обратный – 5'-TGCAAATGGACAAAGTGGGTGTGG-3',

CCNB1 прямой – 5'-AGGAAGAGCAAGCAGTCA-GACCAA-3',

CCNB1 обратный – 5'-GCAGCATCTTCTTGGGCA-CACAAT-3',

PKC прямой – 5'-GCTGTCTTTTCACGATGCCCC-3',

PKC обратный – 5'-CACCCGACGACCCTGAGAGA-3',

β-актин прямой – 5'-ACCAACTGGGACGACATG-GAGAAA-3',

β-актин обратный – 5'-ТТААТГТСАГСАС-GATTTCCCGC-3'.

МТТ-тест

Число живых клеток определяли, используя колориметрический метод, основанный на окислении 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолбромидом (МТТ) в митохондриях живых клеток [46]. Клетки на 6-й день после трансфекции siРНК рассеивали с 6-луночного на 96-луночные планшеты при плотности KB-3-1 – 1.5 × 10³, SK-N-MC – 7.5 × 10³, MCF-7 – 3 × 10³ клеток/лунку (в объеме среды 100 мкл/лунку) и вновь инкубировали в течение от 1 до 6 сут при 37°C. Затем к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации

0.5 мг/мл. Через 3 ч культуральную среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде (100 мкл/лунку) и измеряли оптическую плотность раствора на многоканальном фотометре Multiscan RC («Labsystems») на длинах волн 570 и 630 нм. Результаты представляли как относительную скорость пролиферации, т.е. скорость деления клеток в образце, нормированную на скорость деления клеток в контроле (принятую за 100%). Скорость пролиферации вычисляли по формуле: $V = (D_{12} - D_7)/(\Delta t)$, где D_{12} и D_7 – оптическая плотность в лунках соответственно через 12 и 7 сут после трансфекции, Δt – интервал времени наблюдения за клетками (т.е. $12 - 7 = 5$ сут).

Микроскопический анализ

Для микроскопического анализа клетки нейробластомы SK-N-MC через 48 ч после трансфекции препаратами siРНК рассеивали на круглые покровные стекла диаметром 15 мм, помещенные в лунки 24-луночного планшета, по 10^5 клеток/лунку. Клетки, обработанные только олигофектамином, интактные клетки и клетки, трансфицированные siScr (контроли), инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч; а клетки, трансфицированные siРНК siCyc, siPKC – в течение 3, 5, 7 и 12 сут. После инкубации клетки промывали 0.5 мл DMEM и фиксировали, не снимая со стекла, 4% параформальдегидом в среде DMEM. Затем препараты клеток промывали PBS, обрабатывали в течение 5 мин ацетоном, вновь промывали PBS, окрашивали гематоксилином или по Фельгену [47], заключали в полистирол. Окрашенные препараты клеток нейробластомы SK-N-MC изучали в световом микроскопе DM2500 с цифровой камерой DFC420 («Leica», Германия). Подсчет митозов проводили при увеличении объектива $\times 40$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гены *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, кодирующие важнейшие регуляторные белки клеточного цикла, были выбраны в качестве мишеней для siРНК, поскольку их гиперэкспрессия часто ассоциирована с возникновением различных опухолевых заболеваний.

Анализ уровней экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках линий KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 после трансфекции соответствующими siРНК

Экспрессию целевых генов определяли в клетках линий KB-3-1 (карцинома шейки матки), SK-N-MC (нейробластома) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы). В этих клеточных линиях ранее нами был обнаружен высокий уровень мРНК гена *CCNB1*, несколько меньший уровень мРНК гена *Her2*, а повышенный уровень мРНК гена *PKC* выявлен только в клетках MCF-7 [41].

Действие siРНК на экспрессию целевых генов анализировали по следующей схеме: siРНК в концентрации 200 нМ трансфицировали в клетки, используя в качестве трансфектантов ОлигофектаминTM (SK-N-MC) и Липофектамин 2000TM (другие клеточные линии). Через 1–12 дней после трансфекции (контрольные клетки при длительных экспериментах пересевали каждые 3–4 дня) из клеток выделяли суммарную РНК и определяли уровень специфических мРНК с помощью ПЦР в реальном времени, используя ген β -актина в качестве внутреннего стандарта. Специфичность действия siРНК проверяли по сохранению уровней мРНК β -актина и негомологичных генов-мишеней (рис. 1).

Как видно из рис. 1, все siРНК эффективно и специфично подавляют экспрессию своих генов-мишеней в использованных клеточных линиях, причем максимальное подавление (вплоть до 97–99%) наблюдается через 72 ч после трансфекции. siHer снижала экспрессию только гена *Her2*, но не влияла на экспрессию генов *CCNB1*, *PKC* и β -актина; аналогичные результаты получены и при использовании siРНК siCyc и siPKC. siРНК произвольной последовательности (siScr) также не изменяла уровни экспрессии генов-мишеней.

siHer и siCyc снижали уровни мРНК генов *Her2* и *CCNB1* в клетках всех использованных линий. Через 72 ч после трансфекции уровень мРНК гена *Her2* составил 15% в клетках KB-3-1, 4% в клетках SK-N-MC и 7% – в клетках линии MCF-7 относительно контроля. Уровень мРНК гена *CCNB1* в клетках KB-3-1 через 72 ч после трансфекции siCyc снижался до 22% по сравнению с контролем, до 16% – в SK-N-MC и до 18% – в клетках MCF-7. Трансфекция siPKC снижает уровень мРНК гена *PKC* в клетках MCF-7 до 14% (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что siHer, как ингибитор экспрессии гена *Her2*, наиболее эффективен в клетках линий SK-N-MC и MCF-7, а siCyc наиболее существенно снижает уровень мРНК гена *CCNB1* в клетках SK-N-MC и MCF-7 (рис. 1). Начиная с 4-го дня после трансфекции уровень мРНК всех генов постепенно увеличивался и возвращался к исходному значению к 7–12 сут после трансфекции (рис. 1).

Как видно из рис. 1, кинетические кривые относительного уровня мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* после трансфекции специфическими siРНК носят U-образный характер. Визуально в каждой кривой можно выделить участок снижения уровня специфической мРНК (1–3 день), участок возрастания ее количества (3–7 день) и участок, на котором количество мРНК-мишени стабилизируется на уровне, соответствующем уровню в контрольных клетках (7–12 день). Постепенное восстановление исходного уровня

Таблица 1. Действие siРНК на пролиферацию клеток KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7

siРНК, 200 нМ	Скорость пролиферации*, %		
	KB-3-1	SK-N-MC	MCF-7
Контроль**	100 ± 7	100 ± 6	100 ± 3
siScr	113 ± 10	90 ± 7	93 ± 6
siHer	123 ± 8	36 ± 9	78 ± 2
siCyc	112 ± 9	14 ± 4	73 ± 2
siPKC	117 ± 14	9 ± 3	79 ± 2

*Представлены средние значения по результатам трех независимых опытов ± стандартное отклонение.

**Клетки, обработанные только трансфектантом.

мРНК в клетках связано, вероятно, с клеточным делением, которое приводит к снижению концентрации siРНК в цитоплазме и, как следствие, к ослаблению эффекта РНК-интерференции.

Таким образом, использованные siРНК обеспечивают эффективное подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в опухолевых клетках человека, а анализ их экспрессии на уровне мРНК доказал специфичность действия выбранных siРНК.

Пролиферация клеток линий KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 после восстановления исходного уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*

Ранее нами было показано, что наблюдаемый антипролиферативный эффект исследуемых siРНК обусловлен замедлением деления клеток, а не их гибелью [41]. В настоящей работе мы анализировали изменения скорости пролиферации клеток после восстановления исходного уровня экспрессии генов-мишеней. Зависимость скорости пролиферации клеток KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 от уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* оценивали с помощью МТТ-теста в период с 7 по 12 день после трансфекции соответствующей siРНК (200 нМ), принимая скорость пролиферации клеток в контрольных образцах за 100% (табл. 1). Как и ожидалось, трансфекция неспецифической siScr не приводит к достоверному изменению скорости пролиферации клеток.

Скорость пролиферации клеток линии KB-3-1 после восстановления исходных уровней экспрессии генов-мишеней (*Her2*, *CCNB1*) практически не отличается от скорости пролиферации контрольных клеток. Напротив, скорость пролиферации клеток SK-N-MC и MCF-7 оставалась сниженной даже после восстановления экспрессии генов-мишеней (*Her2*, *CCNB1*). Так, после трансфекции siHer скорость деления клеток SK-N-MC и MCF-7 в промежутке 7–12 сут составляла 36 и 78% от уровня в контроле соот-

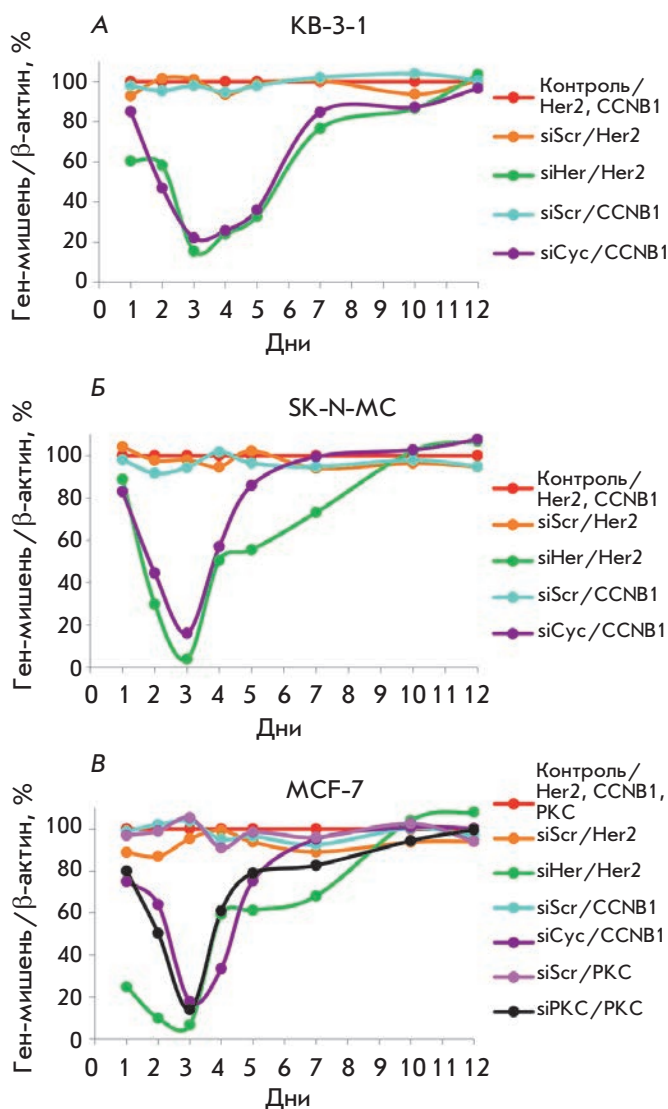
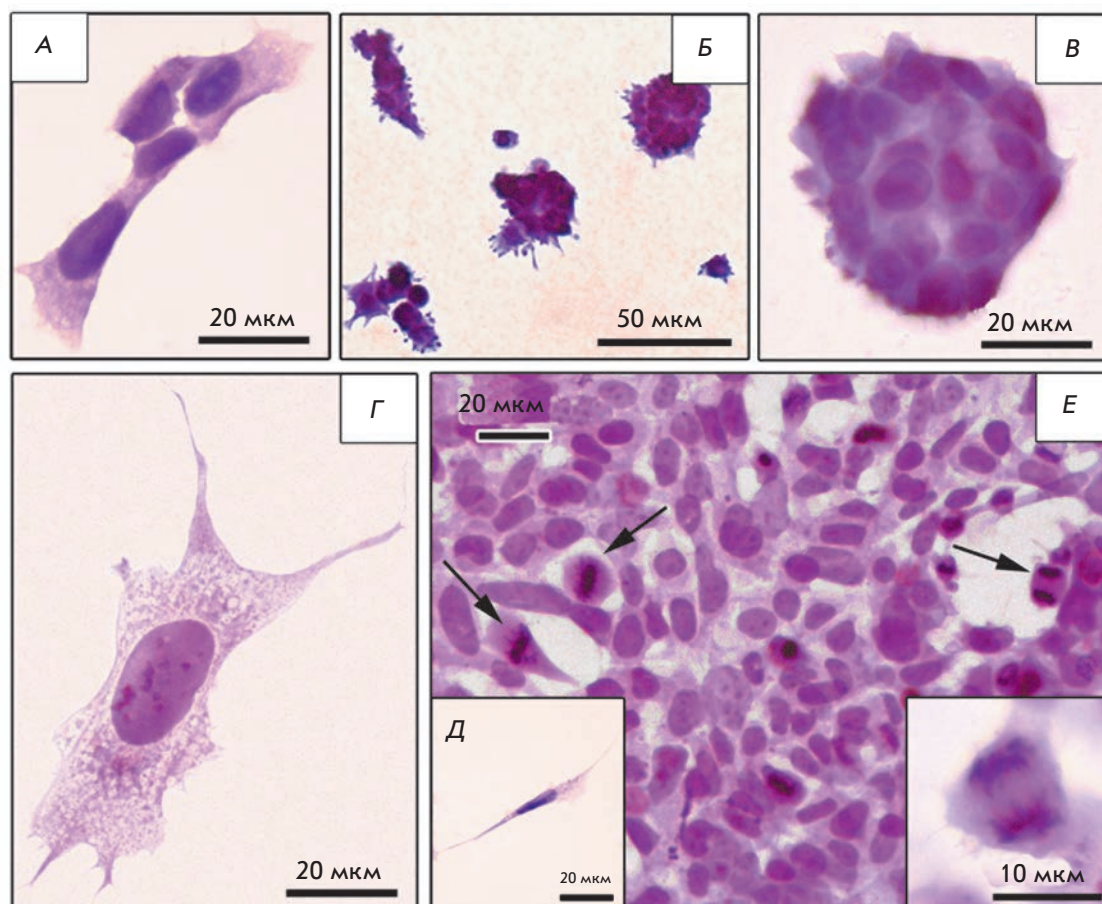


Рис. 1. Относительный уровень мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1 (А), SK-N-MC (Б) и MCF-7 (В) через 1–12 сут после трансфекции соответствующими siРНК (200 нМ). Уровень мРНК β-актина использовали в качестве внутреннего стандарта. Данные суммированы по результатам трех независимых экспериментов. Стандартное отклонение (SD) не превышает 10%. Контроль/гены – относительный уровень мРНК генов в контрольных клетках. siРНК/ген(ы) – относительный уровень мРНК ген(ов) в клетках после трансфекции соответствующей siРНК.

ветственно. Скорость пролиферации клеток SK-N-MC и MCF-7, экспонированных к действию siCyc, оставалась на уровне 14 и 73% от уровня в контроле соответственно, а siPKC – 9 и 79% (табл. 1). Следует отметить, что siPKC оказывает наиболее выраженное и длительное антипролиферативное действие (10-кратное замедление скорости деления) на клет-

Рис. 2. Морфология клеток нейробластомы SK-N-MC на стекле (тотальные препараты). А – «островные» клетки; Б, В – плотные шаровидные скопления клеток; Г – нейроноподобная клетка; Д – веретеновидная клетка; Е – митозы (показаны стрелками) в клетках культуры через 5 сут после трансфекции siСус (200 нМ); на врезке показано расхождение митотических хромосом. Окраска гематоксилином.



ки нейробластомы SK-N-MC, в которых экспрессия гена *PKC* не выявляется используемыми методами (см. [41]). siHer и siСус также оказывали наиболее выраженное антипролиферативное действие на клетки линии SK-N-MC. Таким образом, специфическое подавление экспрессии генов, отвечающих за регуляцию клеточного цикла, способно существенно замедлять и даже останавливать деление клеток SK-N-MC.

Как видно из табл. 1, использованные клеточные линии можно условно разделить на три группы: клетки, скорость пролиферации которых полностью восстанавливается (KB-3-1); скорость пролиферации которых остается значительно сниженной (SK-N-MC); и клетки, скорость пролиферации которых остается сниженной, но незначительно, после восстановления исходного уровня мРНК генов-мишеней. Вероятно, временное подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1*, *PKC* не приводит к необратимым изменениям в путях регуляции деления клеток KB-3-1, поэтому при восстановлении уровней мРНК этих генов восстанавливается и скорость пролиферации клеток. Иначе обстоит дело с клетками SK-N-MC: временное подавление экспрессии этих генов приво-

дит, по-видимому, к необратимым изменениям в путях регуляции пролиферации, поэтому скорость пролиферации остается значительно сниженной даже после восстановления уровней мРНК генов-мишеней. В клетках MCF-7 подавление пролиферации носит промежуточный характер, скорость деления восстанавливается, но не полностью. Это, вероятно, указывает на то, что в данных клеточных линиях гены *Her2*, *CCNB1*, *PKC* играют не одинаковую по важности роль в путях регуляции пролиферации.

Полученные результаты свидетельствуют, что в клетках нейробластомы SK-N-MC наиболее эффективной мишенью для ген-направленного воздействия является ген *PKC*, а в клетках рака молочной железы MCF-7 – *CCNB1*. В клетках SK-N-MC антипролиферативный эффект ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* существенно выше эффекта, обусловленного siHer (табл. 1).

Влияние ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* на морфологические характеристики культуры клеток SK-N-MC

Проведенное исследование показало, что наиболее эффективное ингибирование экспрессии генов

CCNB1 и PKC наблюдается в культуре клеток SK-N-MC нейробластомы человека (табл. 1), поэтому мы провели микроскопическое изучение изменений морфологии и деления клеток этой линии под действием siCyc и siPKC.

Культура клеток нейробластомы SK-N-MC, обработанная ОлигофактаминоTM (контроль), через 24 ч инкубации представлена разными типами клеток (рис. 2). Часть клеток образует на стекле монослой с «островами роста», другая часть формирует небольшие плотные скопления шаровидной формы. «Острова роста» разных размеров состоят из плоских полигональных одноядерных клеток с однородно окрашенной цитоплазмой и неокрашенными вакуолями (рис. 2А), соединяющимися в сети на поверхности стекла. В большинстве случаев «острова роста» имеют достаточно четкие границы, прослеживается тенденция к их слиянию. В «островах роста» встречаются также редкие мелкие шаровидные клетки с крупным ядром, интенсивно окрашенной цитоплазмой и ровной поверхностью. Шаровидные скопления клеток располагаются на стекле как поодиночке, так и группами, по внешнему виду напоминают тутовые ягоды. Клетки скоплений мелкие, интенсивно окрашенные, с короткими игольчатыми или закругленными отростками на поверхности, встречаются и клетки с ровной поверхностью (рис. 2Б,В). Клетки плотно прилегают друг к другу, что делает невозможным их подсчет на тотальных препаратах. Третий тип клеток, присутствующих в культуре нейробластомы SK-N-MC, – крупные распластанные клетки нейроноподобной формы с бледно окрашенной вакуолизированной цитоплазмой (рис. 2Г). Клетки содержат 1–2 ядра, встречаются многоядерные варианты. Нейроноподобные клетки в основном локализируются между «островными» клетками и выделяются на общем фоне своей обособленностью, они крайне редко контактируют с клетками других типов и вокруг них прослеживается пустое пространство, даже если они локализируются в центре «островов роста».

В культуре клеток нейробластомы SK-N-MC присутствуют также небольшие сильно вытянутые клетки веретеновидной или игольчатой формы с редкими вакуолями в цитоплазме (рис. 2Д). Таким образом, на светооптическом уровне в препаратах клеток нейробластомы SK-N-MC выявляются четыре морфологических типа клеток, переходные формы между которыми при использованном методе анализа не наблюдаются.

При инкубации клеток SK-N-MC, обработанных ОлигофактаминоTM в течение 24–72 ч, морфологические характеристики типов клеток не изменяются, на стеклах выявляются все описанные варианты. Наблюдается значительное увеличение общего

Таблица 2. Количество митозов в клетках SK-N-MC через 1–12 сут после трансфекции siCyc и siPKC (200 нМ)

Дни	Количество митозов на 1000 клеток				
	Контроль*	siScr	siCyc	siPKC	Контроль без трансфектанта
1	14 ± 5	16 ± 8	-	-	-
2	40 ± 16	25 ± 7	-	-	22 ± 15
3	21 ± 10	33 ± 12	15 ± 11	16 ± 7	-
5	-	-	30 ± 12	20 ± 11	-
7	-	-	28 ± 6	35 ± 5	-
12	-	-	30 ± 6	49 ± 14	-

*Клетки, обработанные только трансфектантом. (-) – не определяли.

количества клеток на стеклах за счет «островных» клеток, «острова роста» сливаются, и к концу 3 сут инкубации эти клетки составляют основную массу культуры. В «островных» клетках культуры SK-N-MC на протяжении 24–72 ч инкубации отмечаются многочисленные митозы (табл. 2). Количество и размеры шаровидных скоплений клеток, нейроноподобных и веретеновидных клеток заметно не меняются.

Сравнение препаратов интактных клеток SK-N-MC и клеток, обработанных ОлигофактаминоTM, не выявило заметных различий морфологических характеристик клеток. Обработка трансфектантом не приводит к появлению новых вариантов клеток либо к заметному изменению их соотношения. Трансфекция клеток SK-N-MC всеми siРНК также не приводит к появлению новых морфологических типов клеток: на всех сроках инкубации все препараты содержали описанные выше разновидности клеток. Трансфекция клеток SK-N-MC siScr не вызывала заметных изменений в соотношении клеток разного типа в течение 72 ч инкубации по сравнению с препаратами культуры, обработанной олигофактамино.

Изучение препаратов клеток нейробластомы SK-N-MC, полученных через разные промежутки времени после трансфекции, выявило отчетливые морфологические признаки воздействия siCyc и siPKC на жизнедеятельность клеток. При одинаковой «посевной» дозе за 3 сут инкубации клетки, обработанные ОлигофактаминоTM либо трансфицированные siScr, практически полностью заполняли площадь стекла (рис. 3Б,Г), тогда как трансфекция siCyc и siPKC резко замедляла размножение клеток, их число на стекле в это же время было несравненно меньше (рис. 3Д,Ж). Клетки, трансфицированные siCyc и siPKC, инкубировали в течение 12 сут (рис. 3Е,З), а трансфицированные siScr и контрольные клетки нуждались в пересеве каждые 3 сут. Раз-

личия в скорости роста и необходимость пересева контрольных и трансфицированных siScr-клеток не позволяют сравнить морфологические характеристики культуры, трансфицированной siCyc и siPKC, с контрольными препаратами через 5–12 сут инкубации, возможно лишь сопоставление препаратов, инкубированных в течение 72 ч после трансфекции. Препараты клеток SK-N-MC, трансфицированные siCyc и siPKC, в этот период содержали несравнимо меньше «островных» клеток, чем контрольные. Основная часть популяции была представлена мелкими интенсивно окрашенными клетками шаровых скоплений, располагавшихся по нескольку штук. На фоне снижения количества «островных» клеток возрастало относительное число нейроноподобных и веретеневидных клеток. Как и в контроле, митозы выявлялись в основном в «островных» клетках, и их число было резко снижено, особенно по сравнению с препаратами, трансфицированными siScr (табл. 2).

Таким образом, через 72 ч после трансфекции siCyc и siPKC в клетках нейробластомы существенно снижается митотическая активность «островных» клеток, уменьшается их число и соответственно изменяется соотношение между морфологическими типами клеток культуры, возрастает доля нейроноподобных и веретеневидных клеток.

Поздние эффекты (5–12 сут) трансфекции клеток нейробластомы siCyc и siPKC несколько различались. При использовании siCyc число митозов возрастало через 5 сут после трансфекции и оставалось на одном и том же уровне в течение всего периода наблюдений (табл. 2). Клетки в стадии митоза выявлялись главным образом среди «островных» клеток (рис. 2Е), число которых увеличивалось, тогда как количество шаровидных скоплений клеток, нейроноподобных и веретеневидных клеток заметно не изменялось. Следует отметить, что даже после 12 сут инкубации количество клеток нейробластомы на стеклах и число «островных» клеток было существенно меньше, чем в контроле через 72 ч после трансфекции (рис. 3Б,Г,Е). Трансфекция клеток нейробластомы siPKC вызывала более продолжительное снижение числа митозов, его рост регистрировался лишь на 7 сут после трансфекции и продолжался до конца наблюдений (табл. 2). Как и в случае трансфекции siCyc, митозы выявлялись преимущественно в «островных» клетках, число которых нарастало в течение инкубации. Через 5 сут после трансфекции siPKC сохранялось относительное увеличение числа нейроноподобных и веретеневидных клеток, отмеченное через 3 сут, количество шаровидных скоплений клеток не изменялось. Основную долю клеток нейробластомы SK-N-MC через 7 и 12 сут после транс-

фекции составляли «островные» клетки, количество которых интенсивно возрастало вследствие активного митотического деления (табл. 2). Плотность клеток на стекле через 12 сут после трансфекции была максимальной, и превышала плотность в контроле и при трансфекции siCyc (рис. 3Б,Г,Е,З). Таким образом, трансфекция siPKC приводит к более продолжительному блокированию митотического деления клеток нейробластомы SK-N-MC, чем трансфекция siCyc, однако последующий рост числа митозов более выражен и приводит к более интенсивному росту культуры клеток.

Анализ морфологических характеристик нейробластомы SK-N-MC показывает, что главная мишень siCyc и siPKC – «островные» клетки, составляющие основную часть клеточной популяции, и размножение которых подавляется. Воздействие siPKC, по-видимому, сложнее, чем siCyc, и требует дальнейшего изучения. Результаты микроскопического изучения роста клеток SK-N-MC после подавления экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* (рис. 3) хорошо согласуются с данными по влиянию этого подавления на скорость пролиферации этих клеток (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интерферирующие РНК рассматриваются в настоящее время как потенциальные терапевтические агенты, и уже целый ряд препаратов на их основе находится на различных стадиях клинических испытаний [48]. Выявление мишеней, временное подавление экспрессии которых приводит к необратимым для раковой клетки последствиям – терминальной дифференцировке, апоптозу, либо к долговременному подавлению их пролиферации, является актуальной проблемой. Опубликовано достаточно большое количество данных об успешном временном подавлении экспрессии генов, ответственных за возникновение онкологических заболеваний, в том числе генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, использованных нами в качестве мишеней siРНК [4, 6, 7, 49]. Показано, что такое подавление приводит к снижению скорости пролиферации раковых клеток, однако в большинстве опытов ограничиваются инкубацией до 96 ч, в то время как снижение уровня мРНК гена-мишени под действием siРНК сохраняется до 4–5 сут. Данные по длительности влияния siРНК на экспрессию генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* отсутствуют, поэтому нами впервые изучены изменения уровня экспрессии этих генов в течение 12 сут после трансфекции специфичными siРНК. Нами показано, что максимальное снижение уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 наблюдается через 72 ч после трансфекции siРНК. Такое выключение экспрессии этих генов, как показано нами ранее [41],

в разной степени замедляет пролиферацию опухолевых клеток в период с 3 по 7 день их культивирования после трансфекции siРНК. Анализ кинетики изменения уровней специфических мРНК показал, что исходные уровни мРНК восстанавливаются уже на 5–7 день после однократной трансфекции соответствующей siРНК, что определяется, по-видимому, временем жизни siРНК в клетке (рис. 1). Длительность антипролиферативного действия siРНК в разных клеточных линиях существенно отличается. Определение скорости пролиферации клеток в период с 7 по 12 сут после трансфекции siРНК показало, что после восстановления исходного уровня экспрессии гена-мишени скорость пролиферации клеток линии KB-3-1 не отличается от скорости роста клеток в контроле: необработанных клеток, клеток, подвергнутых действию только трансфекционного агента, и клеток, трансфицированных случайной siРНК (siScr). Рост клеток линии MCF-7, трансфицированных специфическими siРНК, оставался несколько замедленным по сравнению с контролем. Таким образом, несмотря на обнаруженный нами выраженный антипролиферативный эффект препаратов siРНК, для ограничения роста этих клеточных линий необходимо поддерживать сниженный уровень экспрессии генов-мишеней. Этого можно добиться, повторно вводя в клетки соответствующие siРНК или используя шпилечные интерферирующие РНК (shРНК), которые экспрессируются непосредственно в клетках-мишенях после их трансдукции рекомбинантными вирусами (адено-, аденоассоциированными-, лентиви- и ретровирусами). Однако проблемы обеспечения безопасности применения рекомбинантных вирусов в терапевтических целях еще далеки от своего решения [50–52].

Мы обнаружили, что в культуре клеток SK-N-MC временное выключение экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* приводит к значительному замедлению деления клеток даже после восстановления исходного уровня мРНК генов-мишеней (табл. 1). Наиболее эффективной мишенью для достижения длительного подавления пролиферации в клетках нейробластомы SK-N-MC служат гены *CCNB1* и *PKC* (табл. 1). Выраженный антипролиферативный эффект (5–10 раз) кратковременного выключения экспрессии этих генов сохраняется до 12 сут инкубации. Следует отметить, что длительное антипролиферативное действие siРНК на клетки SK-N-MC является довольно неожиданным, поскольку в этих клетках не наблюдается гиперэкспрессия гена *PKC* [41]. Тем не менее, наглядно показан длительный антипролиферативный эффект этого специфического ингибитора в клетках SK-N-MC, выяснение причины которого требует дополнительного изучения.

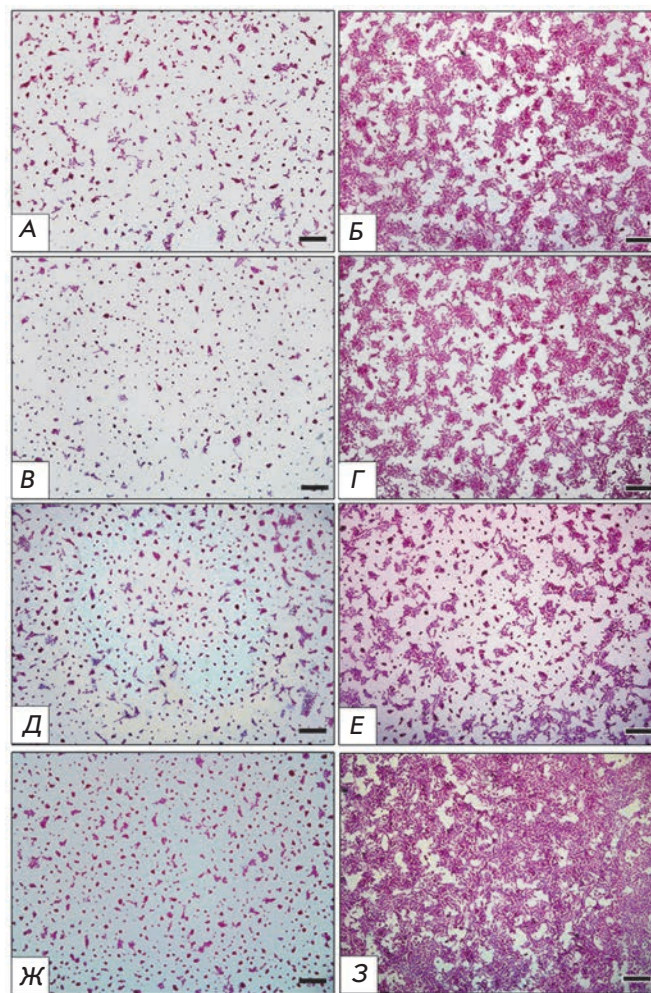


Рис. 3. Клетки нейробластомы SK-N-MC на стекле (тотальные препараты). Контрольные клетки (обработка только трансфектантом): А – 1 сут инкубации; Б – 3 сут инкубации. Трансфекция 200 нМ siScr: В – 1 сут инкубации; Г – 3 сут инкубации. Трансфекция siCyc: Д – 3 сут инкубации; Е – 12 сут инкубации. Трансфекция siPKC: Ж – 3 сут инкубации; З – 12 сут инкубации. Окраска гематоксилином. Длина масштабной линейки 200 мкм.

Скорость пролиферации клеток SK-N-MC остается значительно сниженной даже после того, как siCyc и siPKC перестают существовать в клетках, а уровень их генов-мишеней восстанавливается до исходного уровня. Это весьма неожиданный результат. По-видимому, этот феномен можно объяснить, учитывая специфический паттерн экспрессии генов в клетках нейронального происхождения, к которым относятся клетки SK-N-MC, изменение паттерна экспрессии под действием временного выключения генов-мишеней и его последующую реактивацию. В силу этого, вероятно, даже кратковременное ин-

гибирование экспрессии гена *CCNB1* или *PKC* может привести к очень медленному восстановлению скорости пролиферации клеток (или же к ее полной блокировке) даже после восстановления исходного уровня продуктов каждого из генов-мишеней. Известно, что в клетках данной линии наблюдается дефицит белка p53, т.е. в них отсутствует важнейший участник цепи индукции апоптоза, что, по-видимому, играет немаловажную роль в их неконтролируемой пролиферации [53]. Возможно, что отсутствие этого участника регуляторного каскада может быть одной из ключевых причин отличия последствий кратковременного ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* в этой и в других использованных нами клеточных линиях, скорость пролиферации которых восстанавливалась после того, как уровень гена-мишени возвращался к исходному. Возможно, было бы интересно изучить совместное действие siРНК и ингибиторов p53 на пролиферацию клеток разных линий. Как показали полученные нами результаты, после ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* в культуре клеток SK-N-MC несколько повышалась доля нейроноподобных и веретеневидных клеток, которые характеризовались более низкой митотической активностью, чем другие морфологические типы клеток в культуре. Повышение доли этих клеток может, вероятно, свидетельствовать об индукции начальных событий клеточной дифференцировки (обратимой или необратимой), которая также может быть одной из причин столь длительного антипролиферативного действия выбранных siРНК. Для проверки этих гипотез, необходимо изучить поведение клеток, подвергнутых действию siРНК в течение более длительного времени. Тем не менее, данные о длительном подавлении пролиферации могут указывать на важную роль генов *CCNB1* и *PKC* в агрессивной пролиферации SK-N-MC.

Изучение морфологии клеток SK-N-MC через 3–12 дней после трансфекции показало, что временное ингибирование экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* не приводит к их гибели или терминальной

дифференцировке, на что указывает сохранение разных типов клеток в популяции, а приводит к задержке клеточного деления. Постепенное увеличение к 10–12 сут инкубации суммарного количества клеток в препаратах, трансфицированных специфическими siРНК, и клеток в стадии митоза, в частности, указывает на то, что длительность антипролиферативного действия этих siРНК в клетках нейробластомы, по-видимому, ограничена 12–15 сут.

В настоящей работе на генетическом и морфологическом уровне показано, что гены *Her2*, *CCNB1* и *PKC* – эффективные мишени для специфически адресованных siРНК в клетках нейробластомы, поскольку достигаемое с их помощью снижение уровня экспрессии генов-мишеней приводит к эффективному и длительному ингибированию пролиферации. Применение siРНК для сдерживания роста опухолевых клеток, переживших химиотерапию, может стать одним из компонентов комплексной терапии при опухолевых заболеваниях и нейробластомах в частности. До настоящего времени в качестве противоопухолевых средств применялись низкомолекулярные соединения, найденные эмпирическим путем. Интерферирующие РНК могут стать новым поколением препаратов, существенно превосходящих известные по специфичности, эффективности и отсутствию токсичности. ●

Мы благодарим М.И. Мещанинову и А.Г. Вениаминову за синтез использованных в этой работе siРНК и А.В. Владимирову за помощь в работе с клеточными культурами.

Работа поддержана программами РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 22-1), «Фундаментальные науки – медицине» (грант № 37), Президентской программой поддержки ведущих научных школ (грант № НШ-7101.2010.4), РФФИ (грант № 11-04-01017-а) и Программой интеграционных исследований СО РАН (грант № 41).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sulic S., Panic L., Dikic I., Volarevic S. // *Croat. Med. J.* 2005. V. 46. P. 622–638.
2. Sandhu C., Slingerland J. // *Cancer Detect. Prev.* 2000. V. 24. P. 107–118.
3. Malumbres M., Hunt S.L., Sotillo R., Martin J., Odajima J., Martin A., Dubus P., Ortega S., Barbacid M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. V. 532. P. 1–11.
4. Yuan J.P., Yan R.L., Kramer A., Eckerdt F., Roller M., Kaufmann M., Strebhardt K. // *Oncogene.* 2004. V. 23. P. 5843–5852.
5. Minana M.D., Felipe V., Cortes F., Grisolia S. // *FEBS Lett.* 1991. V. 284. P. 60–62.
6. Wu T.T., Hsieh Y.H., Hsieh Y.S., Liu J.Y. // *J. Cell. Biochem.* 2008. V. 103. P. 9–20.
7. Faltus T., Yuan J.P., Zimmer B., Kramer A., Loibl S., Kaufmann M., Strebhardt K. // *Neoplasia.* 2004. V. 6. P. 786–795.
8. Vermeulen K., van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. // *Cell Prolif.* 2003. V. 36. P. 131–149.
9. Tuschl T. // *ChemBiochem.* 2001. V. 2. P. 239–245.
10. Tabara H., Grishok A., Mello C.C. // *Science.* 1998. V. 282. P. 430–431.
11. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. // *Nature.* 2001. V. 411. P. 494–498.

12. Yarden Y. // *Oncology*. 2001. V. 61. P. 1–13.
13. Nishizuka Y. // *Nature*. 1984. V. 308. P. 693–698.
14. Ali A.S., Ali S., El-Rayes B.F., Philip P.A., Sarkar F.H. // *Cancer Treat. Rev.* 2009. V. 35. P. 1–8.
15. Robert N.J., Favret A.M. // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007. V. 21. P. 293–302.
16. Meric F., Hung M.C., Hortobagyi G.N., Hunt K.K. // *J. Am. Coll. Surg.* 2002. V. 194. P. 488–501.
17. Aaltonen K., Amini R.M., Heikkila P., Aittomaki K., Tamminen A., Nevanlinna H., Blomqvist C. // *Br. J. Cancer*. 2009. V. 100. P. 1055–1060.
18. Koivunen J., Aaltonen V., Peltonen J. // *Cancer Lett.* 2006. V. 235. P. 1–10.
19. Martiny-Baron G., Fabbro D. // *Pharmacological Res.* 2007. V. 55. P. 477–486.
20. Revillion F., Bonnetterre J., Peyrat J.P. // *Eur. J. Cancer*. 1998. V. 34. P. 791–808.
21. Williams T.M., Weiner D.B., Greene M.I., Maguire H.C. // *Pathobiology*. 1991. V. 59. P. 46–52.
22. Wright C., Angus B., Nicholson S., Sainsbury J.R., Cairns J., Gullick W.J., Kelly P., Harris A.L., Horne C.H. // *Cancer Res.* 1989. V. 49. P. 2087–2090.
23. Tandon A.K., Clark G.M., Chamness G.C., Ullrich A., Mcguire W.L. // *J. Clin. Oncol.* 1989. V. 7. P. 1120–1128.
24. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., Mcguire W.L. // *Science*. 1987. V. 235. P. 177–182.
25. Gulati S., Ytterhus B., Granli U.S., Gulati M., Lydersen S., Torp S.H. // *Diagn. Pathol.* 2010. V. 5. P. 18–26.
26. Soria J.C., Jang S.J., Khuri F.R., Hassan K., Lin D., Hong W.K., Mao L. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 4000–4004.
27. Yasuda M., Takesue F., Inutsuka S., Honda M., Nozoe T., Korenaga D. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002. V. 128. P. 412–416.
28. Song Y.M., Zhao C.L., Dong L.J., Fu M., Xue L., Huang Z., Tong T., Zhou Z., Chen A., Yang Z., et al. // *Carcinogenesis*. 2008. V. 29. P. 307–315.
29. Berchuck A., Rodriguez G., Kinney R.B., Soper J.T., Dodge R.K., Clarkepearson D.L., Bast R.C. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991. V. 164. P. 15–21.
30. Berchuck A., Kamel A., Whitaker R., Kerns B., Olt G., Kinney R., Soper J.T., Dodge R., Clarke-Pearson D.L., Marks P., et al. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. P. 4087–4091.
31. Marks J.R., Humphrey P.A., Wu K., Berry D., Bandarenko N., Kerns B.J.M., Iglehart J.D. // *Ann. Surg.* 1994. V. 219. P. 332–341.
32. Carr J.A., Havstad S., Zarbo R.J., Divine G., Mackowiak P., Velanovich V. // *Arch. Surg.* 2000. V. 135. P. 1469–1474.
33. Casalini P., Iorio M.V., Galmozzi E., Menard S. // *J. Cell. Physiol.* 2004. V. 200. P. 343–350.
34. Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T., Semba K., Nomura N., Miyajima N., Saito T., Toyoshima K. // *Nature*. 1986. V. 319. P. 230–234.
35. Pines J., Hunter T. // *Ciba Fdn. Symp.* 1992. V. 170. P. 187–204.
36. Sutherland R.L., Watts C.K.W., Musgrove E.A. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993. V. 47. P. 99–106.
37. Gomez L.A., de las Pozas A., Reiner T., Burnstein K., Perez-Stable C. // *Mol. Cancer Ther.* 2007. V. 6. P. 1534–1543.
38. Sarafan-Vasseur N., Lamy A., Bourguignon J., Le Pessot F., Hieter P., Sesboüé R., Bastard C., Frébourg T., Flaman J.M. // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 2051–2057.
39. Newton A.C. // *Chem. Rev.* 2001. V. 101. P. 2353–2364.
40. Clemens M.J., Trayner I., Menaya J. // *J. Cell Sci.* 1992. V. 103. P. 881–887.
41. Акимов И.А., Черноловская Е.Л. // *Мол. биол.* 2010. Т. 44. С. 98–106.
42. Amarzguioui M., Rossi J.J., Kim D. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 5974–5981.
43. Hohjoh H. // *FEBS Lett.* 2004. V. 557. P. 193–198.
44. Matveeva O., Nechipurenko Y., Rossi L., Moore B., Saetrom P., Ogurtsov A.Y., Atkins J.F., Shabalina S.A. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 1–10.
45. Chattopadhyay N., Kher R., Godbole M. // *Biotechniques*. 1993. V. 15. P. 24–26.
46. Carmichael J., Degraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 936–942.
47. Пирс Э. *Гистохимия*. М.: Иностран. лит., 1962. 962 с.
48. Castanotto D., Rossi J.J. // *Nature*. 2009. V. 457. P. 426–433.
49. Choudhury A., Charo J., Parapuram S.K., Hunt R.C., Hunt D.M., Seliger B., Kiessling R. // *Int. J. Cancer*. 2004. V. 108. P. 71–77.
50. Blankinship M.J., Gregorevic P., Chamberlain J.S. // *Mol. Ther.* 2006. V. 13. P. 241–249.
51. Gao G.P., Wilson J.M., Wivel N.A. // *Adv. Virus Res.* 2000. V. 55. P. 529–543.
52. Snyder R.O., Flotte T.R. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. P. 418–423.
53. Choi M.S., Yuk D.Y., Oh J.H., Jung H.Y., Han S.B., Moon D.C., Hong J.T. // *Anticancer Res.* 2008. V. 28. P. 3777–3784.