

Wstępne wyniki zastosowania techniki interferencji RNA do wyciszania ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* kodujących metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej w komórkach raka płuca linii A549

Preliminary results of application of RNA interference technique to downregulate expression of matrix metalloproteinases: *MMP-2* and *MMP-9* genes in A549 lung cancer cells

Anna Galilejczyk, Daniel Sypniewski, Ilona Bednarek

STRESZCZENIE

WSTĘP

Wzrost guzów nowotworowych, inwazja otaczających tkanek oraz powstawanie przerzutów wymagają degradacji białkowych składników macierzy pozakomórkowej oraz błon podstawnych. Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej odgrywają podstawową rolę w trawieniu składników macierzy i nasilają wiele niekorzystnych zmian w otoczeniu rozwijającego się nowotworu. W przebiegu licznych nowotworów szczególnie podkreśla się negatywną rolę metaloproteinaz należących do grupy żelatynaz. Celem pracy było zaprojektowanie i zastosowanie metody wykorzystującej zjawisko interferencji RNA, pozwalającej obniżyć ekspresję genów *MMP-2* i *MMP-9*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły ludzkie komórki nowotworowe niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549. Wyciszające konstrukcje genetyczne zaprojektowano opierając się na sekwencjach mRNA dla *MMP-2* i *MMP-9*, pochodzących z bazy danych GenBank, za pomocą programu komputerowego *simu*, a następnie wklonowano do plazmidu pSUPER.neo. Po zweryfikowaniu prawidłowości otrzymanych konstrukcji, plazmidowy DNA wykorzystano do transfekcji komórek eukariotycznych A549. Do oceny zmian poziomu ekspresji mRNA *MMP-2* i *MMP-9* zastosowano metodę Real TimeTM RT-PCR.

WYNIKI

W komórkach A549, do których wprowadzono zaprojektowane konstrukcje shRNA/*MMP-2*, po 24 godzinach nie zaobserwowano zmian poziomu mRNA *MMP-2*, natomiast po 10 dniach odnotowano 33,1% spadek ekspresji tego genu.

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Mgr Anna Galilejczyk
Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Narcyzów 1
41-200 Sosnowiec
tel. +48 32 364 10 25
e-mail: annagolda86@gmail.com

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 3, 157–165
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
eISSN 1734-025X

Wydajniejszy był proces wyciszania ekspresji genu *MMP-9*, gdyż w komórkach transfekowanych plazmidami niosącymi konstrukcje shRNA/*MMP-9* zaobserwowano 95,6% spadek liczby kopii mRNA *MMP-9* już po 24 godzinach. Po 10 dniach poziom ekspresji genu *MMP-9* wynosił 26,2% w stosunku do poziomu ustalonego dla komórek kontrolnych.

WNIOSKI

Technika interferencji RNA może być wykorzystywana do wyciszania ekspresji genów żelatynaz związanych z procesem metastazy nowotworów. Wstępne wyniki potwierdziły zdolność zaprojektowanych konstrukcji genetycznych do potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji tychże genów w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549.

SŁOWA KLUCZOWE

MMP-2, *MMP-9*, interferencja RNA, niedrobnokomórkowy rak płuca

ABSTRACT

INTRODUCTION

Tumor growth, invasion of surrounding tissues and metastasis require degradation of the protein components of the extracellular matrix and basement membranes. Matrix metalloproteinases play a major role in the process of digesting ECM components and intensify the adverse effects around the growing tumor. Increased expression and activity of *MMP-2* and *MMP-9* have been observed in many malignancies. The aim of this study was to design and apply a method based on RNA interference to reduce the expression of gelatinases.

MATERIAL AND METHOD

Silencing oligonucleotides directed at *MMP-2* and *MMP-9* genes were designed based on the mRNA sequences (GenBank) in the *siRNA* program. Gene constructs were synthesized and cloned into the pSUPER.neo vector. After verifying their correctness, plasmid DNA was used to transfect human non-small cell lung cancer A549 cells. The changes in the level of *MMP-2* and *MMP-9* mRNA were determined by the Real TimeTM PCR technique.

RESULTS

After 24 hours of shRNA/*MMP-2* construct application, no changes in the *MMP-2* mRNA level were observed. In turn, after 10 days a 33.1% reduction was noticed. Downregulation of the *MMP-9* gene was more efficient. After 24 hours of using plasmids carrying shRNA/*MMP-9* constructs, a 95.6% decrease in the number of *MMP-9* mRNA copies was observed. After 10 days, the level of *MMP-9* gene expression was 26.2% in comparison to the mRNA level established for the control cells.

CONCLUSIONS

The RNA interference technique can be successfully used to downregulate the expression of *MMP-2* and *MMP-9* genes. The obtained results confirmed that our shRNA/*MMP-2* and shRNA/*MMP-9* constructs are capable of reducing the mRNA level in the non-small cell lung cancer A549 cell line.

KEY WORDS

MMP-2, *MMP-9*, RNA interference, non-small cell lung cancer

WSTĘP

Zewnątrzkomórkowa proteoliza komponentów macierzy otaczającej komórki (*extracellular matrix* – ECM) należy do procesów zapewniających homeostazę tkankową organizmu. Jednak podczas rozwoju guzów nowotworowych wzmożona proteoliza przyczynia się do inwazji otaczających tkanek, niekontrolowanego wzrostu guza oraz powstawania przerzutów. Liczne badania potwierdzają fakt, że proteolityczne enzymy zewnątrzkomórkowe, takie jak metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (*matrix metalloproteinases* – MMPs), nasilają wiele niekorzystnych zmian w otoczeniu rozwijającego się nowotworu [1].

Główną rolą MMPs jest degradowanie białek strukturalnych macierzy pozakomórkowej oraz błon podstawnych, takich jak kolagen, lamina, proteoglikany czy fibronektyna, co wiąże się z ułatwieniem migracji komórek. Do substratów MMPs należą również różnorodne czynniki białkowe – czynniki chemotaktyczne, cząsteczki adhezyjne, inhibitory proteinaz, czynniki wzrostowe oraz receptory zlokalizowane na powierzchni komórek [2]. Ze względu na swoją aktywność MMPs pełnią liczne funkcje i są zaangażowane w wiele procesów fizjologicznych i patologicznych wymagających dynamicznych zmian w obrębie ECM. Wzrost ekspresji oraz aktywności różnych MMPs obserwuje się w przebiegu wielu nowotworów, jednak szczególnie podkreśla się podstawową rolę dwóch enzymów z grupy żelatynaz: MMP-2 i MMP-9. Mają one zdolność do degradacji kolagenu typu IV, będącego głównym składnikiem błon podstawnych naczyń krwionośnych. Dzięki degradacji składników ECM i niszczeniu struktur błon podstawnych, żelatynazy usuwają fizyczne bariery ograniczające możliwości wzrostu guzów nowotworowych, umożliwiają naciekanie sąsiednich tkanek, penetrację naczyń krwionośnych oraz tworzenie ognisk przerzutowych [3,4]. Najczęściej podwyższony poziom ekspresji MMPs u chorych na nowotwory koreluje ze złym rokowaniem, większym ryzykiem wznowy oraz krótszym okresem przeżycia pacjenta [5].

Zwiększoną ekspresję żelatynaz w komórkach guza oraz wzrost ich stężenia w osoczu wykazano m.in. w przebiegu nowotworów płuca [6,7]. Pierwotny rak płuca należy do najagresywniejszych i najczęstszych nowotworów złośliwych. Jest również główną przyczyną zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi. Aż u 80% pacjentów z rakiem płuca diagnozowany jest niedrobnokomórkowy rak płuca (*non-small cell lung cancer* – NSCLC). Warunkiem jego chirurgicznego usunięcia jest brak przerzutów, jednak ma on wysoki potencjał metastatyczny i często w momencie rozpoznania stwierdza się obecność guzów wtórnych [8].

Dzięki dynamicznemu rozwojowi wiedzy na temat molekularnych mechanizmów będących podłożem rozwoju nowotworów możliwe staje się opracowanie nowych strategii terapeutycznych. Współczesna inżynieria genetyczna dysponuje narzędziem pozwalającym na wyłączenie aktywności wybranych genów dzięki naturalnie występującemu w komórkach mechanizmowi wyciszania ich ekspresji. Zjawisko interferencji RNA (*RNA interference* – RNAi) jest indukowane obecnością w komórce dwuniciowych cząsteczek RNA (*double stranded RNA* – dsRNA) o sekwencji homologicznej do sekwencji docelowego transkryptu. Pojawienie się egzogennych cząsteczek dsRNA jest dla komórki sygnałem do uruchomienia procesu RNAi, prowadzącego do degradacji obcego materiału genetycznego oraz homologicznych cząsteczek mRNA [9].

W przebiegu procesu RNAi wyróżnić można dwa etapy. W pierwszym dochodzi do enzymatycznej degradacji dwuniciowego RNA przeprowadzanej przez rybonukleazę Dicer. Jest to tzw. etap inicjujący, możliwy zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym. W wyniku hydrolizy dsRNA powstają tzw. krótkie interferujące cząsteczki RNA (*short interfering RNA* – siRNA) o długości 19–23 nukleotydów, zbudowane z nici sensowej i antysensowej, które tworzą 19 nt komplementarny dupleks. Celem drugiego, tzw. wykonawczego etapu przebiegającego w cytoplazmie, jest degradacja docelowej cząsteczki mRNA. Wygenerowane przez Dicer cząsteczki siRNA są wiązane w kompleks białkowy RISC (*induced silencing complex* – RNA), po czym dochodzi do rozplecenia ich dwuniciowej struktury i degradacji jednej z nici. Pozostała nić antysensowa odgrywa rolę przewodnika, umożliwiając aktywnemu kompleksowi RISC odnalezienie w komórce komplementarnej sekwencji mRNA. W wyniku hybrydyzacji dochodzi do wyzwolenia aktywności nukleazowej kompleksu RISC i do przecięcia dupleksu siRNA/mRNA. Przecięta cząsteczka mRNA zostaje następnie zdegradowana przy udziale egzonukleaz [10,11,12,13]. Degradacja endogennych transkryptów skutkuje ograniczeniem wydajności translacji i przyczynia się do redukcji poziomu wybranych białek. Dzięki wysokiej wydajności, specyficzności oraz możliwości uzyskania stosunkowo stabilnego efektu wyciszenia, technika interferencji RNA daje nadzieję na postępy w terapii genowej chorób, w których zmniejszenie poziomu jednego bądź kilku konkretnych białek mogłoby spowodować spowolnienie lub zahamowanie procesu chorobowego [14].

Mając na uwadze wielokierunkowy udział żelatynaz w procesie przerzutowania nowotworów, w ramach niniejszych badań podjęto próbę zastosowania techniki interferencji RNA do wyciszenia ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9*.

MATERIAŁ I METODY

Hodowle komórkowe

Materiał do badań stanowiły ludzkie komórki nowotworowe niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 (ATCC: CCL-185). Hodowlę *in vitro* prowadzono w standardowych warunkach (temperatura 37°C, atmosfera 95% powietrza i 5% dwutlenku węgla) w podłożu wzrostowym RPMI-1640 z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej FBS (PAA Laboratories GmbH) oraz gentamycyny (20 µg/ml) (PAA Laboratories GmbH) w inkubatorze Hera-Cell (Heraeus). Czas podwojenia liczby komórek wynosił ok. 22 godzin. Stan hodowli monitorowano za pomocą mikroskopu odwróconego Axiovert (Zeiss). Żywołność komórek wyznaczano w komorze hemocytometrycznej Neubauera z użyciem roztworu 0,1% błękitu trypanu w soli fizjologicznej (Sigma).

Przygotowanie konstrukcji genetycznych do ekspresji shRNA

W celu wyciszenia ekspresji genów kodujących zelatinazy skonstruowano wektory posiadające w swojej strukturze inserty kodujące cząsteczki shRNA (*short-hairpin RNA*) specyficznie nakierowane względem docelowych sekwencji mRNA metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Konstrukcje genetyczne oparto na cząsteczce tzw. molekularnego wektora ekspresyjnego, jakim był plazmid pSUPER.neo (OligoEngine). Do wyboru sekwencji docelowych w obrębie mRNA badanych metaloproteinaz wykorzystano program komputerowy *sirna*, wchodzący w skład pakietu EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/>). Jako pliki wyjściowe do projektowania *in silico* cząsteczek shRNA wykorzystano sekwencje mRNA dla MMP-2 i MMP-9, pochodzące z bazy danych GenBank (odpowiednio: NM_004530 oraz NM_004994.2). Opierając się na wybranych sekwencjach i algorytmie *sirna*, zaprojektowano 60-nukleotydowe oligomery DNA kodujące shRNA: **MMP2shF**: 5'-GAT CCC CGA GTT GGC AGT GCA ATA CCT TCA AGA GAG GTA TTG CAC TGC CAA CTC TTT TTA-3', **MMP2shR**: 5'-AGC TTA AAA AGA GTT GGC AGT GCA ATA CCT CTC TTG AAG GTA TTG CAC TGC CAA CTC GGG-3', **MMP9shF**: 5'-GAT CCC CAC TAC TCG GAA GAC TTG CCT TCA AGA GAG GCA AGT CTT CCG AGT AGT TTT TTA-3', **MMP9shR**: 5'-AGC TTA AAA AAC TAC TCG GAA GAC TTG CCT CTC TTG AAG GCA AGT CTT CCG AGT AGT GGG-3'. W celu uzyskania dwuniciowych cząsteczek DNA, następnie poddawanych strategii klonowania w strukturę wektora pSUPER.neo, otrzymane oligomery *forward* i *reverse* dla MMP-2 i MMP-9 poddano hybrydyzacji. Uzyskane w ten sposób dwuniciowe inserty zosta-

ły wklonowane w zlinearyzowany uprzednio za pomocą enzymów restrykcyjnych *Bg*III i *Hind*III (Fermentas) wektor ekspresyjny pSUPER.neo pod kontrolą promotora H1. Zrekombinowane plazmidy namnażano w systemie prokariotycznym (hodowle kompetentnych komórek bakteryjnych *E. coli* DH5α, Gibco BRL) oraz wyizolowano metodą lizy alkalicznej. Poprawność klonowania insertów kodujących cząsteczki shRNA względem wektora potwierdzono techniką analizy restrykcyjnej oraz za pomocą sekwencjonowania.

Transfekcja komórek eukariotycznych

Przygotowane konstrukcje genetyczne posłużyły do transfekcji komórek linii A549. W dniu poprzedzającym transfekcję komórki wysiano na 12-dołkowe płytki hodowlane w liczbie 2×10^5 komórek na dołek. Bezpośrednio przed transfekcją usunięto podłoże hodowlane, a komórki przepłukano pożywką RPMI-1640 bez dodatku surowicy. Transfekcję przeprowadzono przy użyciu odczynnika mającego zdolność wiązania plazmidowego DNA i jego przenoszenia do komórek – Nanofectin (PAA Laboratories) – zgodnie z protokołem producenta. Plazmidowy DNA (2 µg) mieszano z odczynnikiem Nanofectin (6,4 µl) w zalecanym stosunku v/v 1: 3.2. W badaniach uwzględniono hodowle kontrolne, w tym: komórki nietraktowane plazmidowym DNA oraz komórki transfekowane oligomerami zaprojektowanymi na podstawie przypadkowej sekwencji SCR (*scrambled*) niewykazującej homologii w stosunku do żadnego ludzkiego genu. Po 24 godzinach od transfekcji do hodowli komórek A549 dodawano czynnik selekcyjny w postaci genetycyny o stężeniu 750 µg/ml. Selekcję pozytywnie transfekowanych komórek linii A549 prowadzono przez 10 dni.

Oznaczanie ekspresji genów MMP-2 i MMP-9 techniką Real-Time RT-PCR

Poziom transkryptów mRNA MMP-2 i MMP-9 w komórkach, w których indukowano proces interferencji RNA, oraz w komórkach kontrolnych oznaczono stosując ilościową technikę RT-PCR z możliwością detekcji produktów reakcji w czasie rzeczywistym (Real-Time™ RT-PCR). Z hodowanych *in vitro* komórek A549 po 24 godzinach oraz po 10 dniach od transfekcji wyizolowano całkowity RNA metodą fenolowo-chloroformową przy użyciu odczynnika Tri-Reagent (Sigma-Aldrich). Izolaty RNA wykorzystano jako matryce w jednostopniowej reakcji RT-PCR. Reakcję prowadzono w 15 µl mieszaniny reakcyjnej, której skład, z wyjątkiem starterów specyficznych dla badanych transkryptów, był identyczny. Ilość całkowitego RNA w każdej reakcji wynosiła 200 ng. Zastosowano barwnik fluorescencyjny SYBR Green I, który interkaluje w strukturę dwuniciowego DNA,

powodując wzrost intensywności fluorescencji proporcjonalny do ilości powstających produktów amplifikacji. Do detekcji mRNA MMP-2 zastosowano startery F: 5'-CAG GGA GCG CTA CGA TGG AG-3' oraz R: 5'-TCC TTG GGG CAG CCA TAG AA-3', natomiast do detekcji mRNA MMP-9 startery F: 5'-GCT CAC CTT CAC TCG CGT G-3' i R: 5'-CGC GAC ACC AAA CTG GAT G-3'.

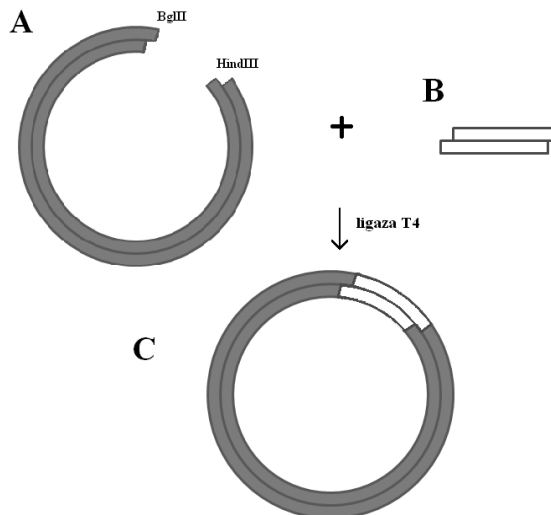
Równocześnie, aby umożliwić porównywanie wyników pomiędzy analizowanymi próbkami, prowadzono amplifikację mRNA tzw. genu referencyjnego w postaci β -aktyny. Gen ten należy do genów metabolizmu podstawowego (*housekeeping genes*), których ekspresja w komórce jest utrzymywana na stałym poziomie. Jego amplifikację prowadzono z zastosowaniem pary starterów: F: 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3' i R: 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'.

Po zakończeniu reakcji przeprowadzono analizę temperatur topnienia (T_m) produktów amplifikacji w celu weryfikacji specyficzności reakcji RT-PCR. Poziom ekspresji badanych genów ustalano posługując się wartością C_t (*Cycle threshold*) oznaczającą wejście reakcji amplifikacji w fazę logarytmicznego przyrostu produktów. Zmiany poziomu mRNA MMP-2 i MMP-9 wyznaczano metodą $\Delta\Delta C_t$, tzw. metodą relatywnej oceny ekspresji w odniesieniu do poziomu ekspresji genu β -aktyny stanowiącego kontrolę endogenną. Jako kalibrator metody wykorzystano hodowle komórek A549 transfekowane plazmidem kontrolnym (konstrukcja shRNA o sekwencji *scrambled*). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w pakiecie Microsoft Office 2007 oraz w programie STATISTICA v. 6.0.

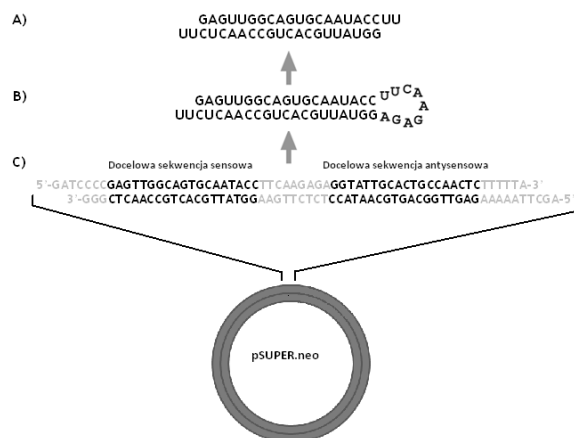
WYNIKI

Etapem warunkującym przeprowadzenie niniejszych badań było uzyskanie prawidłowych konstrukcji genetycznych umożliwiających zainicjowanie procesu interferencji RNA w komórkach nowotworowych. Aby zapewnić ciągłe powstawanie cząsteczek wyciszających ekspresję genów *MMP-2* i *MMP-9* w komórkach (*in situ*), do plazmidu pSUPER.neo wklonowano specjalnie zaprojektowane konstrukcje dsDNA (ryc. 1).

60-nukleotydowe inserty kodują dwa komplementarne odcinki DNA rozdzielone 9-nukleotydową niekodującą sekwencją łącznikową odpowiedzialną za utworzenie tzw. pętli. Dzięki specyficznej budowie insertów ulegają one w komórce transkrypcji do cząsteczek RNA zdolnych do spontanicznego związania się w strukturę spinki do włosów (shRNA). Prekursorowe transkrypty shRNA są w komórkach szybko przekształcane do funkcjonalnych cząsteczek siRNA (ryc. 2).

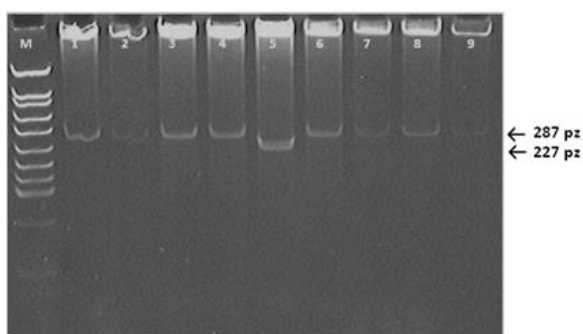


Ryc. 1. Strategia klonowania sekwencji modulatorowych w wektor ekspresyjny pSUPER.neo. A – plazmid pSUPER.neo zlinearyzowany za pomocą enzymów restrykcyjnych *HindIII* i *BglIII*; B – insert (sekwencja kodująca shRNA) posiadający lepkie końce komplementarne do końców powstałych w wyniku cięcia plazmidu enzymami restrykcyjnymi; C – zrekombinowany plazmid (konstrukcja ekspresyjna dla shRNA).
Fig. 1. Strategy of cloning modulating sequences into pSUPER.neo expression vector. A – plasmid pSUPER.neo linearized with restriction enzymes *HindIII* and *BglIII*; B – insert (shRNA coding sequence) with sticky ends complementary to ends generated by cutting plasmid with restriction enzymes; C – recombinant plasmid (construction for shRNA expression).



Ryc. 2. Proces transkrypcji insertu i przekształcanie produktu jego ekspresji (shRNA) do funkcjonalnych cząsteczek siRNA zdolnych do wyciszania ekspresji genu *MMP-2*. C – budowa insertu wklonowanego do plazmidu pSUPER.neo (konstrukcja shRNA); B – produkt transkrypcji oligomeru tworzący spontanicznie strukturę spinki do włosów; A – funkcjonalna cząsteczka siRNA powstająca w wyniku cięcia nukleolitycznego shRNA przez endogenne RNazy.
Fig. 2. Transcription of insert and transformation of resulting product (shRNA) to functional siRNA molecules which are capable of silencing *MMP-2* gene expression. C – sequence of insert cloned into pSUPER.neo plasmid (shRNA construction); B – transcription product spontaneously forming hairpin structure; A – functional siRNA molecule produced by cutting shRNA with endogenous RNases.

W celu uzyskania odpowiedniej puli zrekombinowanych plazmidów wprowadzono je do komórek prokariotycznych *Escherichia coli* szczepu DH5 α , w których plazmidowe DNA jest w naturalny sposób powielane. Transformowane klon *E. coli* selekcjonowano na szalkach z podłożem LB z dodatkiem ampicyliny. Po ich namnożeniu izolowano plazmidowe DNA, który dodatkowo weryfikowano pod względem poprawności klonowania. Analiza restrykcyjna pozwoliła odróżnić klony zawierające wektor z insertem od klonów negatywnych, czyli „pustych”, na podstawie różnicy długości powstających produktów trawienia. Na rycinie 3 przedstawiono przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia plazmidowego DNA za pomocą enzymów *EcoRI* i *HindIII*.



Ryc. 3. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia plazmidowego DNA izolowanego z klonów bakteryjnych transformowanych rekombinowanymi plazmidami zawierającymi inserty kodujące shRNA wyciszające *MMP-2*.
Fig. 3. Example result of electrophoretic separation of digested plasmid DNA isolated from bacterial clones transformed with recombinant plasmids containing inserts encoding shRNA for *MMP-2* silencing.

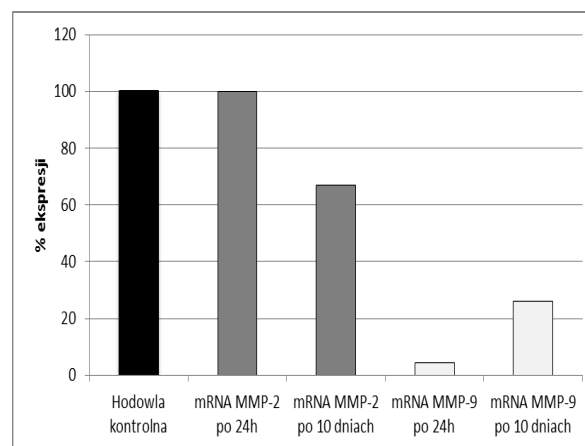
Wybrane izolaty plazmidowego DNA, pochodzące z klonów przyjętych na podstawie wyników analizy restrykcyjnej za pozytywne, zostały poddane sekwencjonowaniu. Pozwoliło to potwierdzić pełną zgodność sekwencji w obrębie insertów oraz ich prawidłową orientację względem otwartej ramki odczytu, umożliwiającą ich ekspresję *in situ*.

W kolejnym etapie badań gotowe preparaty plazmidowego DNA zostały przeznaczone do transfekcji hodowanych *in vitro* komórek raka płuca A549. Analizę efektów modulacji ekspresji badanych genów przeprowadzono po upływie 24 godzin oraz po 10 dniach od transfekcji komórek. Oceny zmian poziomu ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* w komórkach dokonano z zastosowaniem techniki Real Time™ RT-PCR. Relatywny poziom ekspresji wyciszanych genów wyznaczono tzw. metodą ($\Delta\Delta Ct$) w odniesieniu do ekspresji genu β -aktyny.

Jak stwierdzono, zaprojektowane konstrukcje genetyczne shRNA/*MMP-2* oraz shRNA/*MMP-9*, po wprowadzeniu do komórek eukariotycznych A549, pozwalają obniżyć ekspresję genów kodujących badane żelatynazy. Mimo iż postępowanie w trakcie pro-

jektowania oraz realizacji doświadczenia było identyczne w odniesieniu do *MMP-2* i *MMP-9*, odnotowano znaczne różnice w efektywności obniżania poziomu ekspresji badanych genów z wykorzystaniem zastosowanych konstrukcji.

W hodowlach komórek A549, które transfekowano rekombinowanymi plazmidami zawierającymi konstrukcje shRNA/*MMP-2*, po upływie 24 godzin nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *MMP-2*, jednak po 10 dniach nastąpił spadek jego ekspresji do poziomu 66,9% w stosunku do hodowli komórek kontrolnych. W wyniku transfekcji komórek A549 analogicznymi plazmidami rekombinowanymi zawierającymi konstrukcje shRNA/*MMP-9* obserwowano spadek poziomu ekspresji genu *MMP-9* zarówno po 24 godzinach, jak i po 10 dniach. Po upływie doby od transfekcji spadek był bardzo istotny – w komórkach wykryto jedynie 4,4% ilości mRNA *MMP-9* względem poziomu występującego w komórkach kontrolnych, po upływie 10 dni w warunkach prowadzonej selekcji obserwowany poziom ekspresji *MMP-9* był ciągle niski i utrzymywał się w granicach 26,2% wartości odnotowywanej dla hodowli kontrolnej (ryc. 4).



Ryc. 4. Zmiany odsetka relatywnej ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* na poziomie mRNA w linii komórkowej A549 po 24 godzinach oraz po 10 dniach od wprowadzenia do komórek konstrukcji kodujących shRNA w odniesieniu do hodowli kontrolnej. Poziom ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* w komórkach kontrolnych był stały i został przyjęty jako 100%.
Fig. 4. Changes in relative levels of *MMP-2* and *MMP-9* mRNA in A549 culture after 24 hours and 10 days from introduction of shRNA expressing constructions into cells in relation to control culture. Level of *MMP-2* and *MMP-9* gene expression in control cells was stable and considered as 100%.

DYSKUSJA

Zdolność do przerzutowania komórek nowotworowych jest wynikiem wielu złożonych procesów, wśród których niewątpliwie dużą rolę należy przypisać aktywności proteolitycznej enzymów z grupy metalopro-

teinaż, a wśród nich szczególnie MMP-2 i MMP-9 [15]. Konwencjonalne metody leczenia nowotworów obejmujące wycięcie chirurgiczne guzów, radioterapię oraz chemioterapię często nie są skuteczne, zwłaszcza w przypadku tak agresywnych i szybko dających przerzuty nowotworów jak niedrobnokomórkowy rak płuca. W związku z istotnym wpływem MMP-2 i MMP-9 na procesy o charakterze patologicznym, kontrola poziomu degradacji macierzy pozakomórkowej z ich udziałem od dawna była brana pod uwagę jako jedna ze strategii terapii przeciwnowotworowej [16]. Obecnie coraz częściej podejmowane są próby wyciszania ekspresji MMPs na poziomie mRNA. Efekt taki można osiągnąć wykorzystując naturalnie występujące w komórkach zjawisko interferencji RNA, pozwalające na degradację wybranych cząsteczek mRNA w odpowiedzi na wprowadzenie do komórek dwuniciowych cząsteczek RNA. Jednak zastosowanie gotowych sekwencji wyciszających siRNA powoduje jedynie przejściowe wyciszenie ekspresji docelowych genów [17]. Ten krótkotrwały efekt zanika po kilku podziałach komórkowych w wyniku nierównomiernego rozdziału siRNA do komórek potomnych. Rozwiązaniem alternatywnym, zapewniającym ciągłą produkcję siRNA bezpośrednio w komórkach, jest wykorzystanie odpowiednio skonstruowanych wektorów ekspresyjnych. Wprowadzenie do komórek za pośrednictwem wektora ekspresyjnego sekwencji DNA kodującej shRNA zapewnia ciągłą produkcję cząsteczek wyciszających siRNA bezpośrednio w komórkach, przez co możliwe staje się trwałe wyciszenie ekspresji docelowego genu [18].

W przedstawionej pracy, aby zapewnić ciągłą ekspresję wyciszających cząsteczek siRNA, do plazmidu pSuper.neo wklonowano specjalnie zaprojektowane konstrukcje dsDNA, ulegające w komórkach eukariotycznych transkrypcji do cząsteczek RNA zdolnych do spontanicznego tworzenia struktury typu spinki do włosów (shRNA). Przeprowadzone badania pozwoliły potwierdzić specyficzną sekwencyjnie zdolność zaprojektowanych konstrukcji genetycznych do wyciszania ekspresji badanych genów. W komórkach A549, do których wprowadzono zaprojektowane konstrukcje shRNA/MMP-2, po 24 godzinach nie zauważono zmian w poziomie ekspresji mRNA MMP-2, natomiast po 10 dniach od zastosowania strategii wyciszania i w warunkach prowadzonej selekcji odnotowano stosunkowo niewielki, wynoszący 33,1% spadek ekspresji badanego genu. Wydajniejszy był proces wyciszania ekspresji genu *MMP-9*. W tym wypadku w komórkach A549 transfekowanych plazmidami niosącymi konstrukcje shRNA/MMP-9 zaobserwowano aż 95,6% spadek liczby kopii mRNA *MMP-9* już po 24 godzinach. Co istotne, spadek ten utrzymywał się na wysokim poziomie w badanym interwale czasowym. Po upływie 10 dni poziom eks-

presji genu *MMP-9* wynosił 26,2% w stosunku do poziomu ustalonego dla komórek kontrolnych.

Różnice między skutecznością wyciszania ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* mogą mieć zróżnicowane podłoże. Odmienne wydajność procesu może wynikać m.in. z czasu półtrwania samego mRNA wyciszanych MMPs oraz ich białek – produktów ostatecznej ekspresji modulowanych genów. Przyczyną braku widocznego wyciszenia ekspresji genu *MMP-2* po upływie 24 godzin od transfekcji może być stosunkowo długi czas półtrwania cząsteczek jego mRNA [19]. W porównaniu z *MMP-2* cząsteczki mRNA powstające na matrycy genu *MMP-9* charakteryzują się mniejszą stabilnością [20], co znalazło odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Inną przyczyną mniejszej wydajności wyciszania ekspresji genu *MMP-2* może być przyjmowanie przez docelową cząsteczkę mRNA *MMP-2* pewnych lokalnych struktur drugorzędowych, które mogłyby uniemożliwić przyłączanie wyciszających cząsteczek siRNA i zainicjowanie procesu degradacji transkryptów [21]. Mimo uzyskania wysokich wyników *score* w trakcie projektowania *in silico* cząsteczki shRNA/MMP-2 możliwe jest, że transkrypt genu *MMP-2* w warunkach *in vitro* przyjmuje konformację, która ogranicza dostępność sekwencji docelowej dla wyciszających cząsteczek siRNA. W związku z tym zasadne byłoby zweryfikowanie efektów wyciszenia uzyskanych dla kilku odmiennych sekwencji wyciszających, komplementarnych do różnych odcinków docelowego mRNA.

Obserwowany wzrost poziomu transkryptów genu *MMP-9* po upływie 10 dni od transfekcji w porównaniu z wynikami otrzymanymi po 24 godzinach można próbować wyjaśnić wyciszaniem ekspresji wprowadzonego transgenu shRNA/MMP-9 w komórkach nowotworowych na drodze epigenetycznej. W niektórych doniesieniach wykazano spadek wydajności procesu interferencji RNA w komórkach wraz z upływem czasu, mimo syntezy cząsteczek interferencyjnych *in situ*. Utrudniony transport z jądra do cytoplazmy jest tu jednym z czynników obserwowanego spadku wydajności procesu wyciszenia ekspresji genu docelowego [22]. Co istotne, istnieją również dane świadczące o spadku ekspresji w komórkach nowotworowych kompleksu enzymatycznego DICER, spadek taki opisano m.in. dla komórek raka płuca, sutka czy jajnika [23]. Spadek ekspresji DICER niezależnie wiąże się z aktywacją syntezy w komórkach cząsteczek mikroRNA, m.in. miR-103/107 aktywnie hamującego syntezę DICER w komórkach [24].

Skuteczne wyciszenie ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* ma potencjalnie ogromne znaczenie w zapobieganiu rozwojowi raka płuca oraz blokowaniu jego zdolności do przerzutowania. W połączeniu ze skutecznym sposobem dostarczania cząsteczek efekto-

rowych do komórek, leki oparte na shRNA mogą w przyszłości stanowić nową generację terapeutów do leczenia raka i innych chorób związanych z nieprawidłową ekspresją pewnych genów.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia opisujące próby wyciszenia ekspresji żelatynazy techniką interferencji RNA. Niejednokrotnie badania te dotyczą regulacji profilu ekspresji MMPs w komórkach nowotworowych. Z badań Zhi i wsp. [25] wynika, że indukowany proces interferencji RNA skierowany przeciwko MMP-2 prowadzi do zmniejszenia ekspresji tej żelatynazy na poziomie zarówno mRNA, jak i białka. W konsekwencji naukowcy obserwowali znaczny spadek adhezji i inwazyjności badanych przez nich komórek raka trzustki. W badaniach prowadzonych przez Chetty i wsp. [26] wykazano, że transfekcja komórek raka płuca A549 wektorem adenowirusowym niosącym sekwencję kodującą siRNA skierowaną przeciwko MMP-2 powodowała zmniejszenie poziomu syntezy białka MMP-2.

Naukowcy ocenili również wpływ uzyskanego wyciszenia genu *MMP-2* w komórkach A549 na ich inwazyjność, szybkość rozwoju guza, zdolność do angiogenezy i potencjał przerzutowy. W badaniach tych zastosowano myszy model eksperymentalny raka płuca. Po wstrzyknięciu podskórnym komórek A549 u wszystkich myszy obserwowano wzrost guza, który dawał przerzuty do płuc. Natomiast u myszy, którym podano dożylnie wektor adenowirusowy zapewniający ekspresję siRNA przeciwko MMP-2, zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza w miejscu podania komórek A549 oraz brak powstawania przerzutów w płucach. Ponadto w guzie podskórnym u myszy, u których zastosowano opisaną strategię, wystąpiły liczne rozległe regiony martwicze w porównaniu z guzami kontrolnymi.

Praca wykonana w ramach umów KNW-1-151/10 oraz KNW-1-036/P/1/0.

Sukcesy w wyciszaniu ekspresji genów związanych z chorobami, obserwowane w hodowlach komórkowych oraz modelach zwierzęcych, zachęcają do podejmowania prób wykorzystania zjawiska interferencji RNA w leczeniu wielu chorób. Przedstawione osiągnięcia wskazują na możliwość potencjalnego zastosowania strategii RNAi w terapii genowej nowotworów.

WNIOSKI

Technika interferencji RNA może być wykorzystywana w celu wyciszenia ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* związanych z procesem przerzutowania nowotworów.

Zaprojektowane konstrukcje genetyczne shRNA/*MMP-2* i shRNA/*MMP-9* wykazały zdolność do potranskrypcyjnego wyciszenia ekspresji genów kodujących *MMP-2* i *9* na poziomie mRNA w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549.

Poziom ekspresji genu *MMP-2* po 10 dniach od wprowadzenia do komórek konstrukcji wyciszającej shRNA/*MMP-2* wynosił 66,9%.

Wyższą zdolność wyciszenia ekspresji genu zarówno po 24 godzinach od momentu wprowadzenia do komórek modulatora shRNA, jak i po 10 dniach prowadzonej selekcji transfekowanych komórek wykazywały cząsteczki shRNA/*MMP-9*, pozwalające na uzyskanie spadku ekspresji genu *MMP-9* do poziomu 4,4% po 24 godzinach i do 26,2% po 10 dniach.

Wysoco pożądane są dalsze analizy zmian fenotypowych wynikających z modulacji poziomu ekspresji badanych genów.

PIŚMIENNICTWO

1. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141: 52–67.
2. Lipka D., Boratyński J. Metaloproteiny MMP. Struktura i funkcja. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2008; 62: 328–336.
3. Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011; 278: 16–27.
4. Folgueras A.R., Pendás A.M., Sánchez L.M., López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 411–424.
5. Przybyłowska K., Błasiak J. Metaloproteazy macierzowe i ich rola w progresji nowotworów. *Post. Bioch.* 2001; 47: 212–223.
6. Hrabec E., Strek M., Nowak D., Greger J., Suwalski M., Hrabec Z. Activity of type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in primary pulmonary carcinomas: a quantitative analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002; 128: 197–204.
7. Kopczyńska E., Danczewicz M., Kowalewski J., Kardymowicz H., Tyrakowski T. Stężenie metaloproteazy 9 i 2 w surowicy chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2007; 132: 539–541.
8. Lin P.-Y., Yu S.-L., Yang P.-C. MicroRNA in lung cancer. *Br. J. Cancer* 2010; 103: 1144–1148.
9. Pai S.I., Lin Y.-Y., Macaes B., Meneshian A., Hung C.F., Wu T.C. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther.* 2006; 13: 464–477.
10. Sierant M., Nawror B. Charakterystyka zjawiska interferencji RNA, podstawy strukturalne i właściwości siRNA. *Wiad. Chem.* 2003; 57: 569–585.
11. Martineau H.M., Pyrah I.T. Review of the Application of RNA Interference Technology in the Pharmaceutical Industry. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35: 327–336.
12. Milhavet O., Gary D.S., Mattson M.P. RNA interference in biology and medicine. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 629–648.
13. Piotrowska A., Rybarczyk A., Wierzbicki P.M., Kotwas M., Wrońska A., Kmiec Z. Interferencja RNA: mechanizm i możliwości terapeutycznego wykorzystania. *Pol. Ann. Med.* 2009; 16: 138–147.
14. Sledz C.A., Williams B.R. RNA interference in biology and disease. *Blood* 2005; 106: 787–794.
15. Deryugina E.I., Quigley J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25: 9–34.

16. Fisher J.F., Mobashery S. Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25:115–136.
17. Rao D.D., Senzer N., Cleary M.A., Nemunaitis J. Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development. *Cancer Gene. Ther.* 2009; 16: 807–809.
18. Moore C.B., Guthrie E.H., Huang M.T., Taxman D.J. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol. Biol.* 2010; 629: 141–158.
19. Liu J., Xiong W., Baca-Regen L., Nagase H., Baxter B.T. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.* 2003; 8: 1376–1383.
20. Akool el-S., Kleinert H., Hamada F.M. i wsp. Nitric Oxide Increases the Decay of Matrix Metalloproteinase 9 mRNA by Inhibiting the Expression of mRNA-Stabilizing Factor HuR. *Mol. Cell Biol.* 2003; 23: 4901–4916.
21. Shao Y., Chan C.Y., Maliyekkel A., Lawrence C.E., Roninson I.B., Ding Y. Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *RNA* 2007; 13: 1631–1640.
22. Schopman N.C., Liu Y.P., Konstantinova P., ter Brake O., Berkhout B. Optimization of shRNA inhibitors by variation of the terminal loop sequence. *Antiviral Res.* 2010; 86: 204–211.
23. Karube Y, Tanaka H, Osada H i wsp. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2005; 96: 111–115.
24. Hinkal G.W., Grelier G., Puisieux A., Moyret-Lalle C. Complexity in the regulation of Dicer expression: Dicer variant proteins are differentially expressed in epithelial and mesenchymal breast cancer cells and decreased during EMT. *Br. J. Cancer* 2011; 104: 387–388.
25. Zhi Y.H., Song M.M., Wang P.L., Zhang T., Yin Z.Y. Suppression of matrix metalloproteinase-2 via RNA interference inhibits pancreatic carcinoma cell invasiveness and adhesion. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15: 1072–1078.
26. Chetty C., Bhoopathi P., Joseph P., Chittivelu S., Rao J.S., Lakka S. Adenovirus-mediated small interfering RNA against matrix metalloproteinase-2 suppresses tumor growth and lung metastasis in mice. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 2289–2299.