

НОВЫЕ МЕТОДЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА. ПРОЕКТ № 50

Координатор: д-р биол. наук Зенкова М. А.
Исполнители: ИХБФМ, ИЦиГ СО РАН, НГМУ

Новые подходы для направленного воздействия на генетический материал

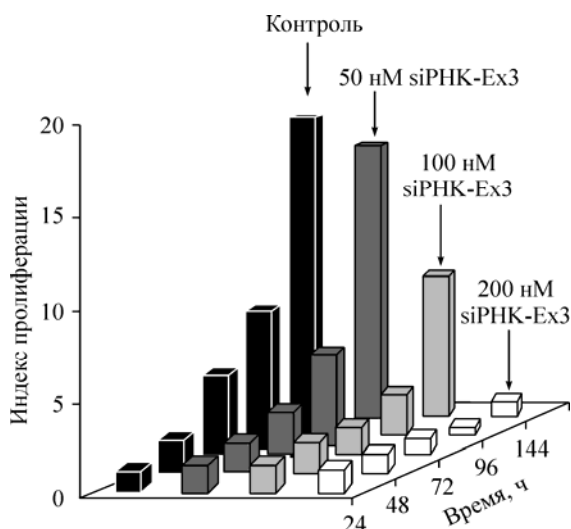
Разработаны новые синтетические катализаторы расщепления РНК, в том числе конъюгат олигонуклеотида и пептида $(LR)_4G$, специфично расщепляющий фосфодиэфирные связи после остатков гуанина в одноцепочечных участках РНК.

Предложена бинарная система расщепления РНК, состоящая из олигонуклеотидов, частично комплементарных РНК и образующих в ней петлю, и искусственной рибонуклеазы, расщепляющей петлевой участок. С помощью

такой системы может быть достигнуто селективное расщепление РНК.

Предложена стратегия создания мультикомпонентных асимметричных НК-энзимов, основанная на сборке НК-энзимов из отдельных олигонуклеотидных доменов — домена, отвечающего за «разворачивание» структуры РНК, и домена, обеспечивающего расщепление РНК. Предложена схема введения химических модификаций в малые интерферирующие РНК, которая позволяет в два—четыре раза увеличить время их жизни в условиях организма.

Подавление экспрессии гена *c-myc* и ингибирование пролиферации опухолевых клеток под действием малых интерферирующих РНК (siRNA)



Разработаны и изучены специфические ингибиторы экспрессии генов семейства *myc* на основе siRNA. Показано, что данные ингибиторы способны специфически снижать концентрацию мРНК гена мишени (*c-myc* и/или *N-myc*) и эффективно подавлять пролиферацию раковых клеток человека. Однократное введение такого препарата в раковые клетки вызывает снижение уровня мРНК гена мишени, длящегося до 12 суток (см. рисунок). Разработанные препараты могут стать основой терапевтического препарата для дифференцированной терапии раковых клеток.

Подавление пролиферации клеток KB-3-1 siRNA.

Arrest of KB-3-1 cells proliferation by siRNA.

Анализ последствий подавления экспрессии нейрогенов *in vivo*

Показано, что антисмысловые олигонуклеотиды и siRNA (малые интерферирующие РНК), действующие на мРНК гена альфа2А — адренорецептора АР, специфически подавляют экспрессию этого гена в стволе мозга. Такое подавление экспрессии гена альфа2А-АР увеличивало время вхождения животных в холдовой наркоз. Эффект ген-направленных препаратов на экспрессию гена-мишени затухает через 3 дня после прекращения введения препарата в мозг. Их влияние на психонейроэндокринные характеристики животных: нейрохимию мозга и поведение проявляется лишь по прошествии времени, необходимого для разрушения имевшегося до начала воздействия пула рецепторов. В 34—40-дневном возрасте крысы, у которых в первые дни жизни временно подавляли экспрессию альфа2А-АР, имели повышенное число рецепторов во фронтальной коре, гиппокампе, амигдале и стволе

головного мозга и демонстрировали сниженную амплитуду вздрагивания, а также дефицит-предпульсное ингибирование, что у животных является моделью клинических симптомов, наблюдаемых при шизофрении и ряде психических расстройств.

Впервые установлено, что кратковременное снижение экспрессии гена альфа2А-АР в критические сроки развития головного мозга вызывает долговременные изменения в формировании этой адренорецепторной системы и приводит к проявлению поведенческих нарушений, которые у человека являются симптомами психических расстройств. Выявленный механизм длительных эффектов ранних воздействий временного изменения уровня экспрессии определенных генов в критические периоды онтогенеза может иметь важное значение для формирования свойств взрослого организма в естественных условиях.

Основные публикации

1. Mironova N. L., Pyshnyi D. V., Ivanova E. M., Zenkova M. A., Gross H. J., Vlassov V. V. Covalently attached oligodeoxyribonucleotides induce RNase activity of a short peptide and modulate its base-specificity// *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32, N 6. P. 1028—1936.
2. Logashenko E. B., Vladimirova A. V., Chernolovskaya E. L., Repkova M. N., Venyaminova A. G., Vlassov V. V. Silencing of multiple drug resistance gene in cancer cells by short double stranded RNA// *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 2004. V. 23, N 6—7. P. 861—866.
3. Kabilova T. O., Chernolovskaya E. L., Vladimirova A. V., Vlassov V. V. Silencing of c-myc expression in tumor cells by siRNA// *Ibid.* P. 867—872.
4. Beloglazova N. G., Fabani M. M., Zenkova M. A., Bichenkova E. V., Polushin N. N., Sil'nikov V. N., Douglas K. T., Vlassov V. V. Sequence-specific artificial ribonucleases. I. Bis-imidazolecontaining oligonucleotide conjugates prepared using precursor-based strategy// *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32, N 13. P. 3887—3897.
5. Vlassov A. V., Koval O. A., Johnston B. H., Kazakov S. A. ROLL: a novel method for producing gene-specific directed libraries// *Oligonucleotides.* 2004. V. 14. P. 210—220.
6. Kuznetsova I. L., Zenkova M. A., Gross H. J., Vlassov V. V. Enhanced RNA cleavage within bulge-loops by an artificial ribonuclease// *Ibid.* 2005. V. 33. P. 1201—1212.