

## АНАЛИЗ ФУНКЦИИ ГЕНОВ В МОЗГЕ СИКВЕНС-СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ НА мРНК

Н.Н. Дыгало

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия,  
e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru

Установлена возможность сиквенс-специфического подавления экспрессии гена-мишени короткой синтетической интерферирующей РНК в головном мозге млекопитающих *in vivo*. С использованием этого подхода обнаружено «программирование» нейрогеном в критический период развития мозга последующих психофизиологических свойств индивида. Кратковременное подавление экспрессии альфа2А-адренорецепторов в мозге новорожденных приводило к формированию аномально низкой тревожности и проявлению в последующие периоды жизни симптомов, наблюдаемых у людей при шизофрении. Согласно этому ранее неизвестному механизму, стресс, терапия или даже материнская забота низкого качества, изменяющие экспрессию нейрогена в раннем онтогенезе, способны предрасполагать к развитию психопатологии. Сиквенс-специфический подход позволил установить участие гена альфа2А-адренорецепторов в формирующемся и зрелом мозге в осуществлении нормальных и аномальных форм поведения, характерных для различных проявлений психопатологии человека. Результаты исследований последних лет открывают новые возможности изучения функции генов в центральной нервной системе и применения РНК интерференции для воздействия на патологические процессы в головном мозге.

### Современные проблемы функциональной нейрогеномики

Мозг является наиболее сложно организованной частью организма млекопитающих. Он состоит из миллиардов нервных клеток различных типов, объединенных синаптическими контактами в прецизионно организованные сети. Многочисленные разветвленные и точно адресованные связи нервных клеток обеспечивают физиологические и поведенческие функции, включая восприятие информации, обучение, память и реагирование на внешние и внутренние стимулы. Разнообразие типов клеток мозга и их объединений проявляется сложными паттернами экспрессии генов. Морфологически и функционально различные типы нейронов характеризуются специфичной для каждого из них экспрессией белков, участвующих в нейротрансмиссии и осуществляющих синтез, метаболизм, накопление, обратный захват и рецепцию нейротрансмиттеров. Считается, что от трети до половины всех генов млекопитающих

исключительно или в основном связано с формированием мозга и обеспечением его функций. Наряду с геномными регуляторами, активность экспрессии многих этих генов может изменяться под влиянием внутренних и внешних для организма факторов. Особенно ясно это проявляется, например, в зависимой от активности нейрона и повышающейся под ее влиянием экспрессии генов раннего ответа. Сведения последнего времени позволяют предполагать, что длительные патологические или, напротив, нейроадаптивные терапевтические эффекты, являющиеся, как правило, проявлениями нарушенной или нормализованной активности определенных нейронов и их цепей, могут вовлекать в механизм своего формирования не только изменения собственно процесса передачи нервного импульса, но и модуляцию экспрессии специфических генов ферментов синтеза, захвата и рецепции нейромедиаторов. Поэтому исследования неясных в настоящее время функций нейрогенов привлекают все увеличивающееся число исследователей и интересны как для функциональной геномики,

так и для поиска возможных путей коррекции патологических процессов в центральной нервной системе.

После завершения в основном расшифровки структуры генома человека и ряда других видов стали возможными практические подходы к выяснению молекулярно-генетического обеспечения работы нейронов, их сетей, а также регулируемых ими висцеральных функций и поведения геномом во взаимодействии с факторами среды. Ключевым для решения этой проблемы является установление функции генов в мозге, а также влияния уровня их экспрессии на деятельность мозга и регулируемые им системы организма и поведение. Основные подходы к решению этой проблемы, которые стали возможными совсем недавно, заимствованы нейронауками из арсенала молекулярной биологии.

Для анализа экспрессии нейрогенов в последнее время все шире используются ДНК-микрочипы, полимеразная цепная реакция в реальном времени, а также разнообразные подходы протеомики. С помощью этих методов получена масса информации. Однако в такой сложной системе, как мозг практически при любой его активности, состоянии или патологическом процессе изменяется экспрессия десятков и сотен генов. Какова функция каждого из них? Какие гены или их белки могут быть перспективными мишенями для терапевтического воздействия?

#### **Сиквенс-специфические подходы анализа функции нейрогенов**

Для получения ответов на поставленные вопросы используют разнообразные методы, способные блокировать экспрессию конкретного гена. Эти подходы можно подразделить на два основных типа: первый связан с изменением структуры гена (постоянные и условные нокауты), а второй включает разнообразные способы постраскрипционного подавления экспрессии генов (антисенс-технология, рибозимы, РНК-интерференция). У животных-нокаутов создается ситуация нулевой экспрессии гена, как правило, на протяжении всего онтогенеза особи (Roth, Yarmush, 1999). Такая особенность этих животных налагает ограничения на

интерпретацию получаемых на данной модели результатов, наиболее очевидными из которых являются возможности онтогенетической и функциональной компенсации перманентной или длительной – недели и месяцы, нулевой экспрессии гена.

Сиквенс-специфические способы снижения уровня экспрессии гена, интересующего исследователя: это основанная на использовании антисмысловых олигонуклеотидов (антисенс-технология), а также базирующаяся на использовании коротких двухцепочечных РНК и получающая все более широкое применение новая технология РНК-интерференции. Сама возможность сиквенс-специфического подавления экспрессии гена-мишени короткой синтетической интерферирующей РНК в головном мозге млекопитающих *in vivo* была установлена совсем недавно (Shishkina *et al.*, 2004b). Антисенс-технология и РНК-интерференция, вызывающие лишь временное снижение экспрессии гена-мишени, длящееся в зависимости от особенностей воздействия часы или дни, значительно более свободны от наложения эффектов компенсаторных процессов.

#### **Биологическая эффективность антисмысловых олигонуклеотидов**

Возможность применения антисенс-технологии продемонстрирована почти тридцать лет назад (Zamecnik, Stephenson, 1978). Однако ее распространение, обусловленное успехами химии олигонуклеотидов, началось лишь в 1990-х гг. (Stein, 2001). В последнее десятилетие эта технология находит применение в исследованиях функции нейрогенов и ее коррекции в патологических ситуациях (Дыгало и др., 2000a; Shiskina *et al.*, 2001, 2002, 2004a, b; Jaeger, Banks, 2004; Pulkkanen, Yla-Herttuala, 2005; Li *et al.*, 2005; Forte *et al.*, 2005; Wick *et al.*, 2006). В результате комплементарного взаимодействия антисмыслового олигонуклеотида с участком мРНК гена-мишени образуется дуплекс, являющийся субстратом РНКазы Н, которая его разрушает и тем самым снижает уровень мРНК гена-мишени. Следствием этого, а также непосредственной помехи дуплекса трансля-

ционному механизму должно быть снижение количества белка-продукта гена-мишени. Однако лишь небольшая часть из синтезируемых олигонуклеотидов высокоэффективно подавляет экспрессию гена-мишени (Stein, 2001). Были проведены обширные экспериментальные и теоретические исследования, включающие и учет пространственной укладки мРНК, для разработки методов выбора структуры наиболее эффективного антисенса (Roth, Yarmush, 1999; Stein, 2001). Потенциальная эффективность олигонуклеотида проверяется, как правило, *in vitro*.

Одну из возможностей сопоставления *in vivo*-эффектов разных антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на близкие и даже перекрывающиеся участки транскрипта одного и того же гена, представили альфа2А-адренорецепторы головного мозга. Стимуляторы альфа2-адренорецепторов применяют для снижения артериального давления и при анестезии в медицинской и ветеринарной хирургии, а их блокаторы предлагаются для лечения мужской импотенции, депрессии, шизофрении, болезней Алцгеймера и Паркинсона (Шишкина, Дыгало, 1997, 2002; Kable *et al.*, 2000). Эти рецепторы принадлежат к мультигенному семейству, отдельные члены которого не различаются существующими лигандами (Шишкина, Дыгало, 1997, 2002; Kable *et al.*, 2000), поэтому была использована антисенс-технология. Были изучены биологические эффекты трех разных тиофосфатов олигонуклеотидов, комплементарных области, содержащей кодон инициации трансляции, или близкой к этому кодону части транскрипта гена альфа2А-адренорецептора. Все три последовательности в большей или меньшей степени перекрываются между собой. Первая нацелена на позиции: от (-11) до (+7) (антисенс-1) (Shishkina *et al.*, 2001, 2002, 2004a, b; Dygalo *et al.*, 2002a, b) вторая: от (+1) до (+21) (антисенс-2) (Mizobe *et al.*, 1996; Robinson, Hudson, 2000); третья от (+4) до (+21) (антисенс-3) (Robinson *et al.*, 1999, 2000; Robinson, Hudson, 2000) мРНК этого гена.

Несмотря на различия в мишенях, все антисенсы были эффективны в отношении поведения животных. Однако дозы каждого

из них, вызывающие заметные эффекты, были различными. При введении в мозг в течение трех дней антисенс-1 уже в дозе 0,06 нмоль активировал двигательную активность неонатальных крысят (Dygalo *et al.*, 2002a), тогда как для получения подобного эффекта на взрослых животных было введено 72 нмоль антисенса-3 (Robinson *et al.*, 1999, 2000). У этих взрослых животных также ослаблялась гипотермическая реакция в ответ на стимуляцию альфа2-адренорецепторов (Robinson *et al.*, 1999, 2000). В то же время уже двух нмолей антисенса-1, введенных в мозг взрослых крыс в течение двух дней, было достаточно для 4-кратного повышения количества выходов животных в открытые рукава приподнятого крестообразного лабиринта (Dygalo *et al.*, 2001; Shishkina *et al.*, 2001, 2002). Внутримозговое введение 15 нмоль антисенса-2 в течение 3 дней значительно повышало устойчивость взрослых крыс против гипногенного действия стимулятора этих рецепторов (Mizobe *et al.*, 1996). Фактически качественные различия – на порядки, в дозах разных олигонуклеотидов, способных вызвать сходные по степени отклонения от контрольного уровня в оцениваемом показателе, позволяют ранжировать эти антисенсы по их биологической эффективности в соответствии с присвоенными им номерами: 1 > 2 > 3. Такое ранжирование антисенсов подтверждается и их относительной эффективностью в подавлении экспрессии гена-мишени. Антисенс-1, введенный в область ствола головного мозга взрослых крыс в дозах 0,06–3 нмоль, специфически снижал уровень мРНК альфа2А-адренорецептора, определенный методом реверсивной полимеразной цепной реакции, а также в зависимости от дозы угнетал оцененную радиолигандным методом экспрессию рецепторного белка в этом отделе мозга (Dygalo *et al.*, 2002a, b; Shishkina *et al.*, 2001). Три нмоля этого антисенса вызывали при введении в течение 3 дней 80 %-ное снижение уровня мРНК и почти 2-кратное уменьшение количества рецепторного белка (Shishkina *et al.*, 2001). Инфузия в головной мозг крыс антисенса-2 в течение недели по 24 нмоль в день приводила к снижению экспрессии этих рецепторов в прилежащих к месту введения областях мозга

на 50–80 % от уровня, наблюдаемого при введении контрольного олигонуклеотида (Robinson, Hudson, 2000). Такая эффективность антисенса-2 в отношении гена-мишени подтверждается и опытами *in vitro* (Mizobe *et al.*, 1996). В то же время антисенс-3, введенный в мозг в течение недели суммарно в количествах 72–168 нмоль, снизил уровень рецепторного белка только в наиболее близких к месту введения участках мозга не более чем на 20–30 % относительно контроля (Robinson *et al.*, 1999, 2000; Robinson, Hudson, 2000).

Следует отметить, что антисенс-2, состоящий из 21 мономера, и такой же длины контрольный олигонуклеотид, при 7-дневном введении в суммарной дозе 168 нмоль вызывали выраженный токсический эффект (Robinson, Hudson, 2000). Создаваемые при таком введении концентрации олигонуклеотидов в мозге превышают порог, после достижения которого часто наблюдаются независимые от сиквенса эффекты (Stein, 2001). Более короткие 18-звенные антисенс-3 и контрольный для него олигонуклеотид в этой же дозе заметных токсических эффектов не имели (Robinson, Hudson, 2000). Различие побочных эффектов 18- и 21-мерных последовательностей может быть связано с их длиной, обуславливающей как большую способность протяженных полимеров неспецифически взаимодействовать в качестве полианионов с белками, так и повышенную вероятность наличия у продуктов деградации более длинного олигонуклеотида эктопических мРНК-мишеней (Stein, 2001). Последняя возможность иллюстрируется присутствием в геноме крысы 43 последовательностей нуклеотидов, комплементарных, по крайней мере, 15 позициям антисенса-2 и лишь 16 таких последовательностей – для антисенса-3. В настоящее время принято, что для повышения специфичности действия антисенса необходимо оптимизировать длину олигонуклеотида в пределах 16–20 пар оснований и применять его в дозах, которые не создают токсические концентрации (Stein, 2001). Так, токсичный в высоких концентрациях антисенс-2 не проявлял этого свойства при концентрации 5 мкМ и при этом эффективно подавлял экспрессию гена-мишени (Mizobe *et al.*, 1996).

Нормированная на введенное количество олигонуклеотида эффективность антисенса-1 в подавлении экспрессии гена-мишени более чем на порядок величин превышает таковую антисенса-3. Антисенс-2 по этому признаку занимает промежуточное положение. Различия в эффективности антисенсов, очевидно, связаны с особенностями вторичной структуры мРНК-мишени. Хотя однозначное установление топологии мишени теоретическими методами представляется пока малореальным, поскольку существующие в настоящее время алгоритмы расчета не учитывают имеющиеся в клетке факторы, способные влиять на вторичную структуру РНК, ее анализ может оказаться полезным. В наиболее вероятной расчетной вторичной структуре участка мРНК альфа2А-адренорецептора, на который нацелены антисмысловые олигонуклеотиды, содержится 11 из 18 или более 60 % неспаренных оснований для мишени антисенса-1. Доля таких позиций в наименее эффективном антисенсе-3 лишь около 20 %, а в промежуточном по эффективности антисенсе-2 – 30 %. Кроме того, оба конца антисенсов -1 и -2, имеющих существенно большую эффективность по сравнению с антисенсом-3, нацелены на неспаренные основания мишени (Dygalo *et al.*, 2002b). Значение неспаренных оснований мишени на концах антисенса для его эффективности отчетливо выявляется при сопоставлении антисенсов 2 и 3. Последний является вариантом первого, укороченным на 3 нуклеотида с 3'-конца. Этот конец более короткой последовательности оказывается локализованным в области G-C шпильки мишени, что теоретически может затруднять спаривание олигонуклеотида с этим участком мРНК. Поскольку такое спаривание является необходимым событием для специфического действия антисенса, то естественно, что олигонуклеотид со сниженной способностью образовывать ДНК-РНК дуплекс, должен иметь и более низкую биологическую эффективность. Несмотря на очевидные проблемы с конструированием биологически эффективных антисенсов с их помощью удастся устанавливать ранее неизвестные функции генов.

### Анализ функции генов в мозге

Экспрессия альфа2-адренорецепторов в стволовой части головного мозга млекопитающих имеет выраженный пик в раннем онтогенезе, который приходится у крыс на первые дни жизни (Юшкова, Дыгало, 1995; Harpe *et al.*, 1999, 2004; Дыгало и др., 2000б). Функция этого пика была неизвестна. У взрослых млекопитающих альфа2-адренорецепторы и прежде всего их А подтип ствола головного мозга участвуют в осуществлении седативного, сноподобного и обезболивающего эффектов стимуляторов этих рецепторов (Mizobe *et al.*, 1996; Шишкина, Дыгало, 2002). Поэтому возможно, что одним из приспособительных значений пика рецепторов в раннем онтогенезе может быть обеспечение спокойного состояния крысят при оставлении матерью гнезда и их охлаждении.

Для анализа такой возможности в ствол мозга крысят на 2–4-й дни жизни вводили антисмысловую олигонуклеотид к альфа2А-адренорецепторам, что подавляло их экспрессию. На это указывало снижение мРНК рецепторов, а также плотности молекул рецепторных белков, определенных по специфическому связыванию их агониста [3H]RX821002 (Шишкина и др., 2003а, б; Shishkina *et al.*, 2004а, б). Этот адренергический лиганд не связывается с имидазолиновыми рецепторами и имеет низкую аффинность по отношению к каким-либо другим рецепторам, исключая собственно альфа2-адренорецепторы, что позволяет использовать его для оценки количества белковых молекул рецептора (Clarke, Harris, 2002). Снижение мРНК-рецепторов в стволе мозга (месте введения препарата) достигало 54 % по сравнению с животными, которым в аналогичных условиях вводили контрольный олигонуклеотид или физиологический раствор (Шишкина и др., 2003а, б). Плотность альфа2-адренорецепторов в стволовом отделе мозга также снижалась на 38 %.

Поскольку одной из основных функций альфа2А-адренорецепторов в норадренергических нейронах ствола головного мозга взрослых млекопитающих является тоническое угнетение

синтеза нейротрансмиттера, нами было проведено определение содержания норадреналина. После введения антисенса содержание этого нейротрансмиттера было 328 нг/г ткани, тогда как у крысят, которым вводили олигонуклеотид случайной последовательности, – лишь 266 нг/г. Обнаруженное повышение уровня норадреналина подтвердило снижение антисенсом функционального пула рецепторов (Шишкина и др., 2003а, б).

Исследование поведения неонатальных крысят после введения антисмыслового олигонуклеотида к альфа2А-адренорецепторам позволило также установить, что этот подтип адренорецепторов с первых дней жизни вовлечен в контроль двигательной активности животных, оказывая в это время на нее угнетающее влияние. Тестирование 2–5-дневных крысят продемонстрировало, что в период с 4-го по 5-й дни параллельно с повышением активности норадренергической системы, вызванной снижением экспрессии альфа2А-адренорецепторов после введения антисенса, наблюдается увеличение количества так называемых «гребковых» движений правой лапкой по сравнению с контрольными животными (Шишкина и др., 2003б).

В наших опытах введение антисенса к рецептору существенно увеличивало время, необходимое 4- и 5-дневным крысятам для впадения в холодовой наркоз по сравнению как с одновозрастным контролем, так и с предыдущими днями жизни (Шишкина и др., 2003а). Этот эффект антисенса, очевидно, является специфическим. Он не обусловлен нарушением психомоторного развития крысят, поскольку животные исследованных групп не различались по способности принимать исходную позу после переворота на спину из положения на животе. Само проявление эффекта лишь после двух введений – через два дня после начала воздействия – также свидетельствует о специфическом механизме действия в наших опытах. Время полужизни белковых молекул альфа2-адренорецепторов, по данным разных исследователей, варьирует от 12 до 48 часов, поэтому для развития специфического ответа антисенса требуется некоторое время, в течение которого

должны разрушиться имевшиеся к моменту начала воздействия молекулы рецептора. Подтверждением специфичности эффекта является обнаружение в проведенном дополнительном фармакологическом анализе на 5-дневных животных ослабления потенцирующего влияния агониста альфа2-адренорецепторов клонидина на развитие вызванного холодом гипнотического состояния у животных, получавших антисенс, по сравнению с контрольными группами (Dygalo *et al.*, 2003a, b).

Эти данные о нейрохимических и поведенческих эффектах антисенса свидетельствуют о том, что одной из функций гена альфа2А-адренорецепторов в неонатальном онтогенезе является осуществление холодовой анестезии. Данная функция гена согласуется с результатами, полученными на взрослых животных, показывающими усиление анальгезии, вызванной плаванием в холодной воде, подтип неселективными агонистами альфа2-адренорецепторов (Bodnar *et al.*, 1983). Подавление экспрессии альфа2А-адренорецепторов антисенсом у взрослых крыс (Mizobe *et al.*, 1996) или мутацией их гена (альфа2А-D79N) у мышей (Lakhlani *et al.*, 1997) значительно снижало или полностью снимало анестезирующий ответ животных на стимуляторы рецепторов. Наши данные, таким образом, включают холодовую анестезию в спектр анестезирующих/усыпляющих ответов, в осуществление которых вовлечен ген А-подтипа альфа2-адренорецепторов. Эти результаты демонстрируют, что действительно, одной из функций гена альфа2А-адренорецепторов является осуществление холодовой анестезии у неонатальных крысят (Шишкина и др., 2003а). Причем было впервые установлено, что уровень экспрессии рецепторов сам по себе может оказывать влияние на развитие анестезирующего ответа без какой-либо стимуляции или блокады экзогенными лигандами. В целом результаты свидетельствуют о том, что регуляция седативных/сноподобных состояний является естественной функцией альфа2А-адренорецепторов, осуществляемой ими при взаимодействии с эндогенным норадреналином.

### Длительные «программирующие» эффекты подавления экспрессии нейрогенов в формирующемся мозге

Условия раннего онтогенеза являются критическими для формирования организма. События, протекающие в эти периоды развития, оставляют длительный след и проявляются изменениями поведения и функции физиологических систем в последующей жизни (Дыгало, 1993; Shishkina, Dygalo, 1994; Шишкина, Дыгало, 1999). Некоторые из наблюдаемых поведенческих отклонений представляют особый интерес. Например, дефицит сенсоримоторного проведения, наблюдаемый у взрослых крыс после перенесенной в неонатальной жизни вирусной инфекции, кратковременного отъема от матери или воспитания в социальной изоляции, является клинически важным симптомом шизофренических и некоторых других специфических нейропсихиатрических расстройств. Механизмы данного явления – длительных последствий ранних воздействий – остаются неясными. Нами было предположено, что его молекулярно-физиологическая основа состоит в изменении экспрессии ключевых для регуляции физиологических систем и поведения генов. Вероятными первоочередными кандидатами на эту роль являются гены, участвующие в развитии и функции центральной нервной системы. Однако ни для одного из них к началу работы «программирующая» функция не была установлена. Наши усилия были направлены на выявление такой функции у гена альфа2А-адренорецепторов, которые играют ключевую роль в регуляции нейрохимической нейротрансмиссии в мозге (Gobert *et al.*, 1998; Scheibner *et al.*, 2001).

Основаниями для выбора именно этого гена послужили несколько обстоятельств. Во-первых, экспрессия альфа2А-адренорецепторов в стволе мозга, где локализованы клеточные тела норадренергических нейронов, достигает наибольшего уровня в течение перинатального периода (Юшкова, Дыгало, 1995; Harpe *et al.*, 1999, 2004; Дыгало и др., 2000б). Этот период является критическим для поведенческого и нейроэндокринного развития (Дыгало, 1993;

Shishkina, Dygalo, 1994; Шишкина, Дыгало, 1999; Shishkina, Dygalo, 2000). Во-вторых, уровень экспрессии альфа2А-адренорецепторов в мозге взрослых особей может быть изменен воздействиями в этот период. Например, пренатальный стресс снижал, в то время как постнатальный хэндлинг, воспитание животных в социальной изоляции, интенсивность материнского ухода повышали плотность альфа2А-адренорецепторов в ряде отделов мозга. И наконец, снижение плотности рецепторов антисенс-технологией в мозге взрослых животных сопровождалось изменениями поведения и эндокринной функции надпочечников, связанных с тревожностью (Dygalo *et al.*, 2001; Shishkina *et al.*, 2001, 2002; Шишкина и др., 2001), повышенный уровень которой является важным симптомом ряда психических расстройств. В целом совокупность наших и литературных данных привела к гипотезе, что альфа2А-адренорецепторы могут быть вовлеченными в раннее программирование некоторых функций и поведенческих реакций.

Для проверки этой гипотезы был использован антисенс-подход, позволяющий путем введения специфического олигонуклеотида, комплементарного матричной РНК альфа2А-адренорецептора, избирательно снизить экспрессию этого гена (Dygalo *et al.*, 2001, 2002a, b; Shishkina *et al.*, 2001, 2002). Антисенс к альфа2А-адренорецепторам был введен крысам в ствол мозга на 2–4-й дни жизни. Контрольным животным в аналогичные сроки онтогенеза вводили олигонуклеотид такой же длины и состава, что и антисмысловой, но произвольной последовательности и специфически не связывающийся с транскриптом ни одного из известных в настоящее время генов млекопитающих. Еще одной группе контрольных животных вводили физиологический раствор.

Снижение экспрессии альфа2А-адренорецепторов после неонатального введения антисмыслового олигонуклеотида, наблюдаемое у 5-дневных крысят, описанное в предыдущем разделе обзора, не было продолжительным. Уровень мРНК рецепторов в стволе мозга 8-дневных крысят, которые на 2–4-й дни жизни получали инъекции антисенса, не отличался

от его значений у животных, получавших в аналогичные сроки онтогенеза контрольный олигонуклеотид или физиологический раствор (Shishkina *et al.*, 2004b).

Помимо острого эффекта, неонатальное введение антисенса существенно изменило развитие альфа2А-адренорецепторной системы мозга. Формирование в онтогенезе этой системы оценивали как по уровню мРНК рецепторов, так и по специфическому связыванию их антагониста [3H]RX821002, характеризующему уровень рецепторного белка (Shishkina, Dygalo, 2004; Shishkina *et al.*, 2004a, b). У 24-дневных животных после неонатального введения антисенса заметно снижен уровень мРНК рецепторов во фронтальной коре и немного увеличена плотность белковых молекул рецепторов в гиппокампе. В стволовой части, миндалевидном комплексе и гипоталамусе их мозга различий по экспрессии альфа2А-адренорецепторов не обнаружено. Также в отделах мозга 24-дневных животных не было обнаружено и каких-либо изменений содержания норадреналина или дофамина.

В 40-дневном возрасте почти во всех исследованных областях мозга (в стволе, фронтальной коре, гиппокампе и амигдале за исключением гипоталамуса) животные, которым неонатально вводили антисмысловый олигонуклеотид, имели достоверно более высокую экспрессию альфа2А-адренорецепторов, чем животные контрольных групп (Shishkina *et al.*, 2004a). Это повышение было транзиторным в большинстве областей мозга и полностью исчезало к 3-месячному возрасту. В этом возрасте уже не выявлялись различия в экспрессии рецепторов между группами ни в стволе, ни в гиппокампе, ни в амигдале. Вместе с тем повышенный уровень экспрессии рецепторов сохранялся у взрослых особей после неонатального воздействия антисенсом во фронтальной коре. Кроме того, у 3-месячных подопытных животных, получавших антисенс, проявлялась повышенная экспрессия рецепторов в гипоталамусе (Shishkina *et al.*, 2004a, b).

После неонатального воздействия антисенсом к полуторамесячному возрасту изменялось и содержание катехоламинов, в регуляции синтеза и высвобождения которых в синаптичес-

кую щель альфа2А-адренорецепторы играют ключевую роль. При этом между плотностью рецепторов и содержанием норадреналина устанавливались новые количественные взаимоотношения. У перипубертатных животных, получавших неонатально антисенс, обнаружено достоверно увеличенное содержание норадреналина в отделах головного мозга, содержащих как тела (ствол), так и проекции норадренергических нейронов (фронтальная кора) при повышенной в этом возрасте экспрессии альфа2А-адренорецепторов. Эти результаты свидетельствуют о нарушении естественных взаимно негативных регуляторных связей между нейротрансмиттером и рецептором у крыс, получавших антисенс. О таком нарушении свидетельствует и свойственное норме содержание у них норадреналина во взрослом состоянии не только в стволе, гиппокампе или амигдале, где плотность рецепторов к этому возрасту уже нормализовалась, но и в коре или гипоталамусе, в которых экспрессия рецепторов у этих животных оставалась повышенной (Shishkina *et al.*, 2004b).

Совместно с длительными эффектами неонатального введения антисенса на экспрессию рецепторов и нейрохимию наблюдались выраженные изменения поведения животных (Shishkina, Dygalo, 2004; Dygalo *et al.*, 2004; Shishkina *et al.*, 2004a, б). Неонатальное угнетение экспрессии рецепторов задерживало развитие сенсоримоторной функции, один из способов оценки которой состоит в регистрации акустического рефлекса вздрагивания. Данный рефлекс является коротколатентным ответом скелетной мускулатуры на неожиданный интенсивный акустический стимул. Препульсное угнетение – нормальное снижение амплитуды вздрагивания, когда акустическому стимулу предшествует стимул меньшей интенсивности, так называемый престимул или препульс. Считается, что этот препульс вызывает подпороговую активацию пути проведения сенсорного сигнала, что угнетает реакцию вздрагивания на последующий стимул. Дефицит в центральных угнетающих механизмах этого рефлекса при применении препульса наблюдается у пациентов, страдающих психиатрическими расстрой-

ствами, такими, например, как шизофрения (Braff *et al.*, 1978), что позволяет использовать этот параметр в моделях психопатологии.

В норме имеются значительные возрастные особенности в проявлении акустического рефлекса вздрагивания как по амплитуде, так и по степени снижения этой амплитуды при предварительном предъявлении престимула. Так, 34-дневные животные демонстрировали большую амплитуду вздрагивания на стимул в 115 децибел, чем 22-дневные, а 3-месячные самцы крыс имели более высокий процент препульсного угнетения, чем 22- или 34-дневные животные. В то же время крысы, которым неонатально вводили антисенс, проявляли в 34-дневном возрасте сниженную по сравнению с контрольными животными и амплитуду вздрагивания, и процент препульсного угнетения при предъявлении престимула в 85 децибел (Shishkina, Dygalo, 2004; Shishkina *et al.*, 2004a). Выявленное ослабление препульсного угнетения может быть полезным для понимания механизмов формирования в онтогенезе важного клинического симптома.

Дефицит препульсного угнетения, а также меньшая амплитуда вздрагивания, обнаруженные в наших экспериментах у 34-дневных самцов крыс, которым неонатально вводили антисенс к альфа2А-адренорецепторам, наблюдались параллельно с повышенной экспрессией альфа2А-адренорецепторов в областях их мозга. Очевидно, что изменение в экспрессии рецепторов вовлечено в задержку развития механизмов, регулирующих эти процессы. Во-первых, повышенное количество рецепторов, локализованных пресинаптически, могут уменьшать высвобождение норадреналина, а угнетение норадренергической системы приводит к дефициту препульсного угнетения и уменьшению амплитуды вздрагивания (Schulz *et al.*, 2002). Кроме того, альфа2А-адренорецепторы как гетерорецепторы изменяют наряду с норадреналином высвобождение и других нейромедиаторов (Gobert *et al.*, 1998; Scheibner *et al.*, 2001). Теоретически возможное изменение высвобождения этих нейротрансмиттеров, участвующих в регуляции акустического рефлекса вздрагивания, например дофамина (Mansbach *et*

*al.*, 1988; Hoffman, Donovan, 1994) и/или серотонина (Sipes, Geyer, 1994), могут вовлекаться в наблюдаемое снижение амплитуды вздрагивания и процента препульсного угнетения у 34-дневных крыс после неонатального подавления экспрессии альфа2А-адренорецепторов.

Во все исследованные периоды онтогенеза (ювенильный, перипубертатный и взрослый) животные, которым неонатально вводили антисенс, характеризовались сниженной эмоциональной реакцией на стрессирующие воздействия. У ювенильных и перипубертатных животных была достоверно снижена спонтанная двигательная активность в условиях новой обстановки (тест «открытое поле»), уменьшена амплитуда вздрагивания на предъявление акустического сигнала. Кратковременное подавление экспрессии альфа2А-адренорецепторов в неонатальном мозге привело к выраженному уменьшению тревожности у взрослых крыс. Эти животные демонстрировали большее количество входов в открытые рукава, большую продолжительность проводимого в этих рукавах времени, а также более чем двукратное повышение уровня исследовательской активности (свешиваний головы вниз с открытых рукавов) в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (Dygalo *et al.*, 2004; Shishkina *et al.*, 2004b). Этот тест является одним из наиболее широко используемых методов для оценки уровня тревожности у грызунов (Pellow *et al.*, 1985; Holmes, 2001). Длительные эффекты специфически проявляются в разные сроки онтогенеза. В отличие от перипубертатного периода, где сниженной эмоциональной стрессорной реактивности животных после неонатального подавления экспрессии альфа2А-адренорецепторов соответствовал сниженный уровень кортикостерона в крови, у взрослых животных различий по этому показателю обнаружено не было. Наблюдаемое снижение тревожности у взрослых животных, безусловно, является следствием уменьшенной экспрессии альфа2А-адренорецепторов в неонатальном периоде. Этот вывод был подтвержден использованием нового метода ген-направленного подавления экспрессии – РНК-интерференции (Shishkina *et al.*, 2004b).

### РНК-интерференция в формирующемся головном мозге

Наряду с антисенс-подходом (Stein, 2001), РНК-интерференция широко используется для выявления функций отдельных генов (Tuschl, 2003). Короткие интерферирующие РНК (siRNA) являются эффективным инструментом функциональной геномики и перспективны в качестве сиквенс-специфических средств терапии. siRNA легко вводятся в клетки *in vitro* путем электропорации или липофекции. Однако применение этих средств доставки siRNA внутрь клетки не всегда приемлемо *in vivo*, поскольку катионные липиды и электропорация сами по себе способны вызвать серьезные нарушения функции тканей, например, нервной, которые и планируется изучить при помощи РНК интерференции. Одна из первых попыток использовать нестимулированный захват клетками мозга siRNA не увенчалась успехом (Isacson *et al.*, 2003). Причинами такого результата могут быть как неспособность клеток без специальной стимуляции захватывать siRNA в достаточном для проявления эффекта количестве, так и, возможно, очень ограниченная область распространения siRNA в мозге, которая в этом исследовании не контролировалась.

Для решения вопроса о способности клеток мозга захватывать «голую» siRNA в эффективных количествах мы использовали новорожденных крысят. Ткань их головного мозга менее плотна, чем у взрослых животных. Распространение в ней введенных препаратов способно вовлечь в зону своего действия достаточное для проявления биологического эффекта число клеток. Тогда, если клетки мозга способны захватывать siRNA, а сама siRNA способна индуцировать разрушение РНК-мишени, следует ожидать изменение функций, зависящих от белка, кодируемых РНК мишенью.

«Голая» siRNA, нацеленные на разные сайты РНК-мишени альфа2А-адренергического рецептора, вводили в мозг крысят и сопоставляли их действие с описанными выше эффектами антисмыслового дезоксиолигонуклеотида, подавляющего экспрессию рецепторов. Кроме того, с помощью флюоресцентно меченного

олигонуклеотида было исследовано его распространение в развивающемся мозге крысы. Через час после введения 5 мкл препарата в область ствола головного мозга крысят он распространяется в объеме, примерно равном сфере с радиусом 1–1,2 мм. В этот объем входят основные группы клеток, продуцирующих норадреналин и экспрессирующих альфа2А-АР. Через сутки после трехдневного введения препарата примерно 30–40 % клеток этой зоны содержат видимые во флюоресцентном микроскопе количества олигонуклеотида (Dygalo *et al.*, 2003a, b, 2004a, 2005).

Эффекты siRNAs оказались зависимыми от их структуры, определяемой сайтом мишени, на которые они были нацелены. Лишь один (siRNA-3) из 4 исследованных конструкторов приводил к заметному, примерно 50 %, снижению альфа2-АР мРНК в мозге. Достоверное понижение уровня этого транскрипта вызывало и антисенс, нацеленный на тот же, что и siRNA-3, сайт мишени. Эффективность siRNA-3 подкреплена и снижением после его введения плотности альфа2А-АР в мозге, определенной по числу мест специфического связывания их антагониста 3Н-RX-821002 (Dygalo *et al.*, 2005).

Через сутки после первого введения siRNA-3 продолжительность охлаждения крысят, необходимая для впадения в холодовой наркоз, не менялась. Однако уже через двое суток после начала применения препарата у животных, получавших siRNA-3, продолжительность впадения в наркоз была существенно большей, чем у всех других групп. Введение клонидина дозозависимо увеличивало продолжительность холодowego наркоза крысят. Доза в 10 мкг клонидина увеличила временной интервал от полной неподвижности до первого движения лапкой в 7 раз. В то же время применение siRNA-3 полностью блокировало эффект клонидина на продолжительность холодowego наркоза. Уровень норадреналина был повышен в стволе головного мозга 5-дневных крысят, которым вводили siRNA-3 на 2–4-й дни жизни. Содержание нейротрансмиттера в коре при этом не менялось (Dygalo *et al.*, 2005).

Таким образом, в этих опытах удалось эффективно подавить экспрессию гена альфа2А-АР в головном мозге «голой» siRNA.

Этот эффект наблюдается, по крайней мере, в раннем онтогенезе, что позволило выявить присущие этому рецептору функции в развивающемся мозге. Отличие наших результатов от предпринимавшейся ранее неудачной попытки использования «голой» siRNA в мозге, очевидно, состоит, прежде всего, в большей области распространения препарата. В наших опытах она составляла более 5 мм<sup>3</sup> и охватывала значительную долю клеток в зоне введения препаратов. При использованной (Isacson *et al.*, 2003) скорости инфузии (0,2 мкл/ч) весь препарат мог быть поглощен очень небольшой группой клеток в непосредственной близости от сайта введения. Таким образом, впервые было получено свидетельство эффективного сиквенс-специфического подавления экспрессии гена-мишени *in vivo* «голой» короткой интерферирующей РНК, введенной в головной мозг. Этот эффект siRNA открывает новые возможности исследования функций генов в центральной нервной системе и применения РНК интерференции для подавления патологических процессов в головном мозге.

Метод антисенс-технологии, как уже описано выше, основан на связывании антисмыслового олигонуклеотида с комплементарной последовательностью РНК, сопровождающемся угнетением экспрессии кодируемого этой РНК белка частично через активацию РНказы Н, разрушающей искомым мРНК на уровне дуплекса РНК-ДНК (Stein, 2001). РНК-интерференция – процесс ген-сайленсинга, в котором введенная двухцепочечная РНК вызывает гомологично-зависимую деградацию мРНК-мишени с участием индуцируемого РНК комплекса белков ген-сайленсинга (RISC-RNA Inducible Silencing Complex) (Tuschl, 2003). Мы обнаружили, что независимо от молекулярных деталей механизма подавления экспрессии гена введение крысятам антисмыслового олигонуклеотида или двухцепочечной РНК против альфа2А-адренорецепторов на 2–4-й дни жизни вызывало заметное снижение уровня экспрессии рецепторов на 5-й день жизни и выраженное уменьшение тревожности у взрослых животных. Введение же неонатальным крысятам контрольных олигонуклеотида или РНК не вызывало ни умень-

шения экспрессии рецепторов в неонатальном мозге, ни снижения тревожности у взрослых животных (Shishkina *et al.*, 2004b).

В целом проведенные исследования выявили, что снижение экспрессии нейروجена в мозге в неонатальный период развития оказывает длительное воздействие на нейрохимические, гормональные и поведенческие характеристики животных, иными словами, уровень экспрессии нейروجена в критические сроки развития мозга программирует свойства взрослого организма. Программирующая функция гена описана впервые. Совершенно ясно, что программирование вряд ли исчерпывается тревожностью. Оно может распространяться на спектр функций и поведение, в регуляции которых участвуют адренергические рецепторы альфа2А-типа, например, на репродуктивное поведение особей мужского пола (Dygalo *et al.*, 2001b, 2002c; Shishkina *et al.*, 2001). Механизм «программирования», очевидно, включает апоптоз (Dygalo *et al.*, 2004b; Меньшанов и др., 2006) и нейрохимические изменения в формирующемся мозге, а также длительные эффекты на его нейрхимию во взрослом состоянии (Shishkina *et al.*, 2004a, b).

Таким образом, кратковременное подавление в мозге новорожденных крысят экспрессии альфа2А-адренорецепторов РНК-интерференцией приводит у взрослых особей к аномалиям поведения, подобным признакам нарушения тревожности, сопровождающей многие психиатрические расстройства у людей. Важность этого механизма состоит в способности обычных факторов раннего онтогенеза, таких, как стресс, терапия или качество материнской заботы, индуцировать изменения в экспрессии нейروجена, подобные действию РНК интерференции и, следовательно, как установлено, предрасполагать к развитию психопатологии в последующие периоды жизни.

Применимость РНК интерференции для исследования и коррекции функции мозга в настоящее время активно обсуждается в литературе (Thakker *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006). С помощью направленных на экспрессию генов подходов ожидается получение важных практических и теоретических результатов в сравнительно новой

области биомедицинской науки – функциональной геномике, так же, как и в ее конкретных разделах, таких, как функциональная нейрогеномика, ряд последних сведений из которой представлены в данном обзоре.

Работа поддержана грантами РФФИ № 05-04-48252 и № 10.5 программы СО РАН «Интеграция».

## Литература

- Дыгало Н.Н. Приобретение стероидами гормональных функций в эволюции и их эффекты в раннем онтогенезе // Усп. соврем. биологии. 1993. Т. 113. Вып. 2. С. 162–175.
- Дыгало Н.Н., Калинина Т.С., Шишкина Г.Т. Анализ поведенческих эффектов рецептора нейромедиатора путем антисенс нокдауна его гена // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2000а. Т. 86. № 10. С. 1278–1282.
- Дыгало Н.Н., Юшкова А.А., Калинина Т.С. и др. Онтогенетические корреляции уровня норадреналина и плотности адренергических рецепторов в головном мозгу крыс // Онтогенез. 2000б. Т. 31. № 1. С. 53–56.
- Меньшанов П.Н., Баннова А.В., Ильиных Ф.А. и др. Антисенс технология выявления «скрытой» функции гена рецептора нейротрансмиттера в регуляции апоптоза клеток формирующегося мозга // Информ. вестник ВОГИС. 2006. данный выпуск.
- Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н. Молекулярная физиология адренергических рецепторов // Усп. физиол. наук. 1997. Т. 28. № 1. С. 61–74.
- Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н. Гены, гормоны и факторы риска формирования мужского фенотипа // Усп. физиол. наук. 1999. Т. 30. № 3. С. 49–61.
- Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н. Подтип-специфические клинически важные эффекты альфа2-адренорецепторов // Усп. физиол. наук. 2002. Т. 33. № 2. С. 30–40.
- Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н., Калинина Т.С., Маснавиева Л.Б. Ген альфа2А-адренергического рецептора влияет на устойчивость крысят к холодовому наркозу // Докл. РАН. 2003а. Т. 388. С. 571–573.
- Шишкина Г.Т., Калинина Т.С., Маснавиева Л.Б., Дыгало Н.Н. Альфа2А-адренорецепторы головного мозга угнетают двигательную активность новорожденных крысят // Журн. высш. нервн. деят.-сти. 2003б. Т. 53. № 5. С. 646–650.
- Шишкина Г.Т., Сахаров Д.Г., Дыгало Н.Н. Роль альфа2а-адренорецепторов синего пятна в регуляции уровня кортикостерона в плазме крови самцов //

- Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т. 131. № 3. С. 263–264.
- Юшкова А.А., Дыгало Н.Н. Изменения числа альфа-2- и бета-адренорецепторов ствола и коры головного мозга крыс в онтогенезе // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 1995. Т. 81. № 2. С. 7–11.
- Bodnar R.J., Merrigan K.P., Sperber E. Potentiation of cold-water swim analgesia and hypothermia by clonidine // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983. V. 19. № 3. P. 447–451.
- Braff D., Stone C., Callaway E. *et al.* Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics // *Psychophysiology*. 1978. V. 15. P. 339–343.
- Clarke R.W., Harris J. RX 821002 as a tool for physiological investigation of alpha(2)-adrenoceptors // *CNS Drug Review*. 2002. V. 8. P. 177–192.
- Dygalov N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Regulation of alpha2A-adrenergic receptor expression in the rat brain by testosterone // *Trabajos del Instituto Cajal*. 2001. V. 78. P. 76–77.
- Dygalov N.N., Kalinina T.S., Sourina N.Y., Melnikova L.B. Effects of neonatal treatment with antisense oligodeoxynucleotide to alpha2A-adrenergic receptor on noradrenergic system of rat brain // *Stress: Neural, Endocrine and Molecular Studies / Eds R. McCarty, G. Agulera, E. Sabban, R. Kvetnansky*. London, N.Y., Philadelphia, Singapore: Taylor and Francis Group. 2002a. P. 205–209.
- Dygalov N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Biological efficacy of antisense oligonucleotides complementary to over-lapping regions of the mRNA target // *Russ. Chem. Bull. International Edition*. 2002b. V. 51. № 7. P. 1031–1034.
- Dygalov N.N., Kalinina T.S., Sourina N.Y., Shishkina G.T. Effects of testosterone on alpha2A-adrenergic receptor expression in the rat brain // *Psychoneuroendocrinology*. 2002c. V. 27. № 5. P. 585–592.
- Dygalov N., Shishkina G., Kalinina T. *et al.* Short interfering RNA (siRNA) is able to inhibit gene expression in mammalian brain and behavioral functions of the targeted gene // 6th IBRO Congress. 10–15 July. 2003a, Prague, Czech Republic. 2177.
- Dygalov N., Shishkina G., Kalinina T. *et al.* RNA interference and antisense knock-down revealed acute and long-lasting programming functions of alpha2a-adrenoceptors in developing brain // Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting. 2003b. New Orleans, USA, 9265.
- Dygalov N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Expression of alpha2A-adrenergic receptors in the brain involved in neonatal programming of anxiety in adult rats // *Behavioural Pharmacology*. 2004a. V. 15. № 5/6. P. A14.
- Dygalov N.N., Bannova A.V., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Clonidine increases caspase-3 mRNA level and DNA fragmentation in the developing rat brainstem // *Developmental Brain Res.* 2004b. V. 152. P. 225–231.
- Dygalov N., Shishkina G., Kalinina T. *et al.* Sequence-specific inhibition of gene expression by «naked» short interfering RNA in mammalian brain // *Intern. Conf. on Chemical Biology*. Novosibirsk, 2005. P. 32.
- Forté A., Cipollaro M., Cascino A., Galderisi U. Small interfering RNAs and antisense oligonucleotides for treatment of neurological diseases // *Curr. Drug Targets*. 2005. V. 6. № 1. P. 21–29.
- Gobert A., Rivet J.M., Audinot V. *et al.* Simultaneous quantification of serotonin, dopamine and noradrenaline levels in single frontal cortex dialysates of freely-moving rats reveals a complex pattern of reciprocal auto- and heteroreceptor-mediated control of release // *Neuroscience*. 1998. V. 84. P. 413–429.
- Happe H.K., Bylund D.B., Murrin L.C. Alpha-2 adrenergic receptor functional coupling to G proteins in rat brain during postnatal development // *J. Pharmacol. and Exptl. Ther.* 1999. V. 288. P. 1134–1142.
- Happe H.K., Coulter C.L., Gerety M.E. *et al.* Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study // *Neuroscience*. 2004. V. 123. P. 167–178.
- Hoffman D.C., Donovan H. D1 and D2 dopamine receptor antagonists reverse prepulse inhibition deficits in an animal model of schizophrenia // *Psychopharmacology*. 1994. V. 115. P. 447–453.
- Holmes A. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001. V. 25. P. 261–273.
- Isacson R., Kull B., Salmi P., Wahlestedt C. Lack of efficacy of «naked» small interfering RNA applied directly to rat brain // *Acta Physiol. Scand.* 2003. V. 179. P. 173–177.
- Jaeger L.B., Banks W.A. Antisense therapeutics and the treatment of CNS disease // *Front. Biosci.* 2004. V. 1. № 9. P. 1720–1727.
- Kable J.W., Murrin L.C., Bylund D.B. *In vivo* gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors // *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 2000. V. 293. № 1. P. 1–7.
- Lakhlani P.P., MacMillan L.B., Guo T.Z. *et al.* Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via «hit and run» gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses *in vivo* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 9950–9955.
- Li Y.F., Wang Y., Channon K.M. *et al.* Manipulation of neuronal nitric oxide synthase within the paraventricular nucleus using adenovirus and antisense technology // *Methods Mol. Med.* 2005. V. 112. P. 59–79.

- Mansbach R.S., Geyer M.A., Braff D.L. Dopaminergic stimulation disrupts sensorimotor gating in the rat // *Psychopharmacology (Berl)*. 1988. V. 94. № 4. P. 507–514.
- Mizobe T., Maghsoudi K., Sitwala K. *et al.* Antisense technology reveals the alpha2A adrenoceptor to be the subtype mediating the hypnotic response to the highly selective agonist, dexmedetomidine, in the locus coeruleus of the rat // *J. Clin. Invest.* 1996. V. 98. № 5. P. 1076–1080.
- Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // *J. Neurosci. Methods*. 1985. V. 14. P. 149–167.
- Pulkkanen K.J., Yla-Herttuala S. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status // *Mol. Ther.* 2005. V. 4. P. 585–598.
- Robinson E.S., Hudson A.L. *In vitro* and *in vivo* effects of antisense on alpha 2-adrenoceptor expression // *Methods Enzymol.* 2000. V. 314. P. 61–76.
- Robinson E.S., Nutt D.J., Hall L. *et al.* Autoradiographical and behavioural effects of a chronic infusion of antisense to the alpha2D-adrenoceptor in the rat // *Br. J. Pharmacol.* 1999. V. 128. № 3. P. 515–522.
- Robinson E.S., Nutt D.J., Jackson H.C., Hudson A.L. Behavioural and physiological effects induced by an infusion of antisense to alpha(2D)-adrenoceptors in the rat // *Br. J. Pharmacol.* 2000. V. 130. № 1. P. 153–159.
- Roth C.M., Yarmush M.L. Nucleic acid biotechnology // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 1999. V. 1. P. 265–297.
- Scheibner J., Trendelenburg A.U., Hein L., Starke K. Alpha2-adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in alpha2-adrenoceptor subtype-deficient mice // *Br. J. Pharmacol.* 2001. V. 132. P. 925–933.
- Schulz B., Fendt M., Schnitzler H.U. Clonidine injections into the lateral nucleus of the amygdala block acquisition and expression of fear-potentiated startle // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. № 1. P. 151–157.
- Shishkina G.T., Dygalo N.N. Effect of glucocorticoids injected into pregnant female mice and rats on weight of male sexual glands in adult offspring and testosterone level in fetus is genotype-dependent // *Experientia*. 1994. V. 50. № 8. P. 721–724.
- Shishkina G.T., Dygalo N.N. Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans // *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 2000. № 1. P. 45–51.
- Shishkina G.T., Dygalo N.N. Short-term reduction in neonatal brainstem  $\alpha$ 2A-adrenergic receptors alters the development of the receptor system and acoustic startle reflex in rats // *Behavioural Pharmacology*. 2004. V. 15. № 5/6. P. A26.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Sournina N.Yu., Dygalo N.N. Effects of antisense to the alpha2A-adrenoceptors administered into the region of the locus coeruleus on behavior in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats // *J. Neurosci*, 2001. V. 21. № 2. P. 726–731.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Sournina N.Y. *et al.* Effects of antisense oligodeoxynucleotide to the alpha2A-adrenoceptors on the plasma corticosterone level and on elevated plus-maze behavior in rats // *Psychoneuroendocrinology*. 2002. V. 27. № 5. P. 593–601.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Popova N.K., Dygalo N.N. Influence of neonatal short-term reduction in brainstem alpha2A-adrenergic receptors on receptor ontogenesis, acoustic startle reflex, and prepulse inhibition in rats // *Behav. Neurosci.* 2004a. V. 118. № 6. P. 1285–1292.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Attenuation of  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood // *Neuroscience*. 2004b. V. 129. P. 521–528.
- Sipes T.A., Geyer M.A. Multiple serotonin receptor subtypes modulate prepulse inhibition of the startle response in rats // *Neuropharmacology*. 1994. V. 33. № 3/4. P. 441–448.
- Stein C.A. The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. № 5. P. 641–644.
- Thakker D.R., Hoyer D., Cryan J.F. Interfering with the brain: Use of RNA interference for understanding the pathophysiology of psychiatric and neurological disorders // *Pharmacol. and Ther.* 2006. V. 109. P. 413–438.
- Tuschl T. Mammalian RNA interference // *RNAi: a guide to gene silencing* / Ed. G.J. Hannon. York: Cold Spring Harbor, 2003. P. 265–295.
- Wick W., Naumann U., Weller M. Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma // *Curr. Pharm. Des.* 2006. V. 12. № 3. P. 341–349.
- Xie F.Y., C.Woodle M.C., Lu P.Y. Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development // *Drug Discovery Today*. 2006. V. 11. № 1/2. P. 67–73.
- Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. № 1. P. 280–284.

## ANALYSIS OF GENE FUNCTIONS IN THE BRAIN BY SEQUENCE SPECIFIC TARGETING OF THE mRNAs

**N.N. Dygalo**

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru

### Summary

The ability of a small synthetic interfering RNA to induce sequence-specific inhibition of the targeted gene expression in mammalian brain *in vivo* was established. This approach helped to discover previously unknown «programming» function of gene expression in the brain during critical period of development in determining of forthcoming psychophysiological reactions of individual. Application of the sequence-specific methods unraveled functions of the brain alpha2A-adrenergic receptors in the development and manifestation of normal and pathologic forms of behavior. Temporal inhibition of alpha2A-adrenergic receptors expression in the brain of newborns caused the development of abnormally low level of anxiety and manifestation of symptoms characteristic for human schizophrenia in future periods of life. This previously unknown mechanism may be responsible for predisposition of individual to psychopathology by stress, therapy or even maternal maltreatment of the offspring since all these early life events are capable of influencing gene expression in the developing brain. Targeted alterations of gene expression by RNA-interference would be perspective for unraveling brain functions and for treatment of brain disorders.