

АНТИСЕНС-ТЕХНОЛОГИЯ ВЫЯВЛЕНИЯ «СКРЫТОЙ» ФУНКЦИИ ГЕНА РЕЦЕПТОРА НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТОК ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ МОЗГА

П.Н. Меньшанов, А.В. Баннова, Ф.А. Ильиных, Г.Т. Шишкина,
Т.С. Калинина, Н.Н. Дыгало

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

Рассмотрен пример использования сиквенса-специфического подавления экспрессии гена *in vivo* для выявления его «скрытой» функции, а также оценена возможность фармакологического контроля специфичности эффектов антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на рецепторные белки. Установлено влияние рецепторов норадреналина альфа2-типа на экспрессию гена программируемой гибели клеток каспазы 3 в головном мозге млекопитающих в критический период его формирования. Антисмысловый олигонуклеотид к альфа2А-адренорецепторам повышал в коре мозга новорожденных крысят уровни мРНК и белка ключевой исполнительной протеазы апоптоза каспазы 3, определенных методами РТ-ПЦР и иммуноблота соответственно. Связь эффекта антисенса с подавлением экспрессии гена-мишени подтверждается отсутствием изменений уровней мРНК и белка каспазы 3 после воздействия контрольным олигонуклеотидом, а также возможностью фармакологической компенсации недостаточной экспрессии альфа2-адренорецепторов, вызванной антисенсом, стимулятором этих рецепторов клонидином.

Организирующие эффекты нейротрансмиттеров в раннем онтогенезе мозга

В ходе раннего онтогенеза головной мозг млекопитающих в результате необходимого для его нормального развития апоптоза теряет большое количество избыточных клеток. От этого процесса в значительной мере зависят структура и функции центральной нервной системы (Pettmann, Henderson, 1998). На возможное влияние нейротрансмиттера норадреналина на апоптоз в раннем онтогенезе мозга указывает увеличение у неонатальных животных числа клеток Кахаля–Ретциуса после разрушения норадренергических терминалей, локализованных возле этих нейронов (Naqui *et al.*, 1999). В пользу этого свидетельствует и ярко выраженный пик экспрессии ключевых регуляторов функции норадренергических нейронов – ауторецепторов альфа2-типа (Kable *et al.*, 2000) в головном мозге в перинатальный период раз-

вития (Юшкова, Дыгало, 1995; Winzer-Serhan *et al.*, 1997; Nappe *et al.*, 1999, 2004; Дыгало и др., 2000; Mausouri *et al.*, 2001) – в сроки активного протекания в мозге апоптоза (Fetter *et al.*, 1990). Согласование активной экспрессии гена альфа2А-адренорецепторов и протекания апоптоза отмечено также в межпальцевой мезенхиме при формировании конечностей в эмбриогенезе мыши или при индукции апоптоза адренергическими препаратами в культурах клеток *in vitro* (Wang, Limbird, 1997). В дополнение к перечисленным данным имеются сведения о влиянии адренергических препаратов на апоптоз кардиомиоцитов (Zhu *et al.*, 2000), нервных клеток в культуре (Noh *et al.*, 1999) или при преходящей фокальной ишемии (Savitz *et al.*, 2000).

Перечисленные факты позволяют предполагать, что организующая функция норадреналина в онтогенезе мозга, опосредованная его рецепторами, может быть связана с модуляцией процесса апоптоза. Однако сведения о влиянии

альфа2-адренорецепторов на жизнеспособность клеток мозга противоречивы. Наряду со стимуляцией гибели клеток (Martel *et al.*, 1998; Gustafson *et al.*, 1989, 1990) имеются сведения и о ее предотвращении агонистами этих рецепторов (Yuan *et al.*, 2001; Laudenbach *et al.*, 2002). Одной из причин противоречий может быть неодинаковое влияние рецептора на жизнеспособность клеток разных отделов мозга. Так, стимулятор альфа2-адренорецепторов клонидин повышал уровень мРНК основной протеазы апоптоза клеток нервной системы каспазы 3 в стволовой части, но не в коре головного мозга неонатальных крыс (Dygalo *et al.*, 2004). Указания на возможную причастность альфа2-адренорецепторов коры к регуляции гибели ее клеток могут быть получены сопоставлением изменений плотности рецепторов и уровня мРНК каспазы 3 в критические сроки онтогенеза.

Экспрессия альфа2-адренергических рецепторов и каспазы 3 в мозге неонатальных крыс

Для анализа онтогенетических динамик плотности альфа2-адренергических рецепторов и уровня мРНК каспазы 3 использовали 20–21-дневные плоды и 2–40-дневных крысят линии Вистар, которых не подвергали каким-либо воздействиям. Образцы ткани мозга выделяли на холоде после быстрой декапитации животных. Число альфа2-адренергических рецепторов определяли в препаратах мембран клеток, приготовленных из ткани мозга и содержащих 0,3–0,4 мг белка. Эти мембраны инкубировали с 1,6 нМ антагониста альфа2-адренорецепторов [3H]RX821002 (Amersham, UK) в 50 мМ Tris-HCl, 1 мМ MgCl₂ буфере (pH 7,5) в течение 40 мин при 22 °С в отсутствие (общее связывание) или в присутствии (неспецифическое связывание) 100 мкМ адреналина (Serva, USA), как описано ранее (Shishkina *et al.*, 2004b). Альфа2-адренергический лиганд [3H]RX821002 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).

Тотальную РНК выделяли одноступенчатым гуанидин-изотиоцианатным методом и получали из нее кДНК (5 мг РНК, 200 нг oligo(dT)-праймаера, 50U обратной транскриптазы MuLV (СибЭнзим, Россия) в 20 мкл 90 мин при 42 °С). Участки кДНК амплифицировали на приборе Master Cycler Gradient 5331 (Eppendorf AG, Германия) с использованием праймеров aagccgaaactcttcac и tgagcattgacacaatacac для каспазы-3 (Suzuki, Farbman, 2000) или cgtgaaaagatcacccagat и attgccgatagtgatgacct для β-актина (Nudel *et al.*, 1983). Уровень мРНК каспазы-3 оценивали, как и в предшествующих наших исследованиях (Калинина и др., 2001), относительно уровня мРНК β-актина после сканирования в УФ продуктов ПЦР (BioDoc II, Biometra GmbH, Германия), разделенных электрофорезом в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (1 мкг/мл) путем компьютерной денситометрии (Scion Image; Scion Corporation, 2000, США).

Полученные с помощью описанных выше методов онтогенетические динамики плотности альфа2-адренергических рецепторов и уровня мРНК ключевой протеазы апоптоза каспазы 3 в ЦНС крыс в раннем периоде ее формирования, представленные на рис. 1, свидетельствуют о зависимости характера изменений каждого из этих параметров и взаимоотношений между ними от отдела головного мозга. Плотность рецепторов начинает быстро увеличиваться в период, предшествующий рождению, как в стволе, так и в коре мозга плодов крыс. Однако если в стволе плотность рецепторов, быстро достигнув выраженного пика в первые дни жизни, затем резко снижалась, то в коре этот параметр прогрессивно нарастал до 24-го дня жизни. Содержание мРНК каспазы 3 находится на высоком уровне уже в мозге плодов. Вместе с тем, если в стволе после рождения он резко снижался, фактически повторяя характер изменения плотности альфа2-адренорецепторов, то в коре содержание мРНК протеазы менялось в узком диапазоне и имело тенденцию к изменению в противоположном по сравнению с онтогенетической динамикой плотности рецепторов в этом отделе мозга направлении.

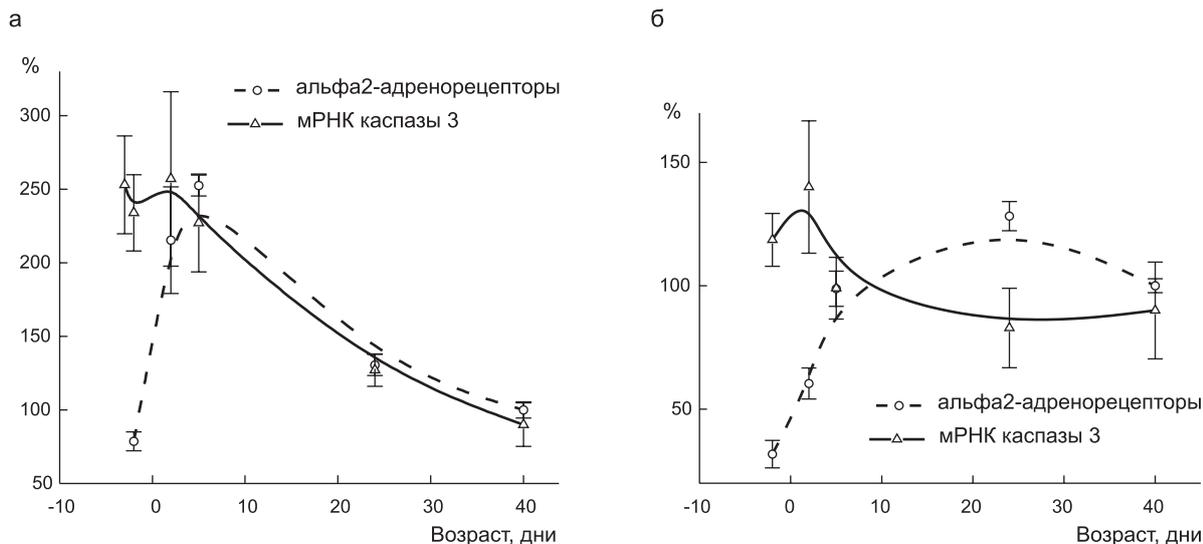


Рис. 1. Изменение плотности альфа2-адренергических рецепторов и уровня мРНК ключевой протеазы апоптоза каспазы 3 в стволе (а) и коре (б) головного мозга в ходе перинатального онтогенеза крыс. По оси Y – % относительно 40-го дня, принятого за 100 %. Все значения для каспазы 3 смещены по оси Y на минус 10 для предотвращения наложения отдельных точек на рис. а и б, а также слияния линий для постнатальных изменений обоих показателей на рис. а.

Выявленные особенности онтогенеза протеазы и рецептора свидетельствуют, что если альфа2-адренорецепторы и участвуют в регуляции экспрессии каспазы 3 в формирующемся головном мозге, то их функции в стволовой и корковой областях, скорее всего, неодинаковы. Так, параллелизм изменения уровня мРНК каспазы 3 и плотности адренорецепторов в стволе мозга неонатальных крысят возможен при индукции рецептором экспрессии этой протеазы. Такая функция рецептора подкрепляется повышением мРНК каспазы 3 в этом отделе мозга стимулятором альфа2-адренорецепторов клонидином (Dygalo *et al.*, 2004). В отличие от параллельного снижения обоих показателей в стволе, в коре изменение уровня мРНК каспазы 3 скорее происходит в противофазе плотности адренорецепторов, что противоречит возможности стимуляции рецептором экспрессии протеазы в этом отделе мозга. Действительно, даже высокая доза клонидина (10 мкг/кг) не изменяла уровень мРНК этой протеазы в коре головного мозга неонатальных крысят (Dygalo *et al.*, 2004). Альтернативное действие альфа2-адренорецепторов, направленное на ограничение

экспрессии каспазы 3 в коре, не противоречит онтогенезу этих показателей в мозге. Однако, исходя из неспособности даже высокой дозы клонидина понизить уровень мРНК каспазы 3 в коре (Dygalo *et al.*, 2004), следует предположить две возможности: либо негативная регуляция рецептором экспрессии протеазы уже осуществляется на максимальном уровне имеющимися рецепторными молекулами при взаимодействии с доступным эндогенным норадреналином, либо альфа2-адренорецептор вообще не регулирует экспрессию каспазы 3 в этом отделе мозга. Различить эти альтернативы возможно оценкой эффекта длительной модуляции экспрессии рецепторов на уровень экспрессии каспазы 3 в коре мозга неонатальных крыс. Реальным в настоящее время подходом осуществления такой модуляции является сиквенс-специфическое подавление экспрессии гена-мишени.

Применение синтетических олигонуклеотидов для подавления экспрессии гена-мишени *in vivo*

Антисмысловый синтетический дезоксиолигонуклеотид (антисенс) к альфа2A-адрено-

рецепторам (agcccatgggcgcaaac) был введен крысятам линии Вистар на 2–4-й дни жизни в мозг (0,36 мкг/5 мкл в день; 1 мм каудальнее ламбды; 5,5 мм ниже черепа) под холодовым наркозом (Danneman, Mandrell, 1997) с помощью модифицированного стереотаксического прибора. Эти экспериментальные процедуры соответствуют российским и международным нормам гуманного обращения с животными и одобрены соответствующим комитетом ИЦиГ СО РАН. Контрольным животным в аналогичные сроки онтогенеза вводили олигонуклеотид такой же длины и состава, что и антисмысловый, но произвольной последовательности (gacgaccsagtgagcagc). Этот олигонуклеотид не имеет заметной гомологии и, следовательно, не связывается ни с одним из известных в настоящее время транскриптов млекопитающих. Оба использованных олигонуклеотида являлись фосфоротиоатами. Еще одной группе контрольных животных в мозг вводили физиологический раствор. На 5-й день жизни представителям каждой из экспериментальных групп, получавшим на 2–4-й дни антисенс, контрольный олигонуклеотид или физиологический раствор, подкожно вводили клонидин (Serva, USA) в дозах 0, 1 или 4 мкг/кг. Этим животным исследовали на 6-й день жизни.

В дополнение к определению уровня мРНК каспазы 3 уже описанным в предыдущем разделе способом оценивали также и количество белка этой протеазы. Для этого образцы ткани гомогенизировали в лизирующем буфере (150 mM NaCl, 50 mM трис-HCl (pH 7,4), 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF и по 1 мкг/мл леупептина, пепстатина и апротинина). После центрифугирования (14,000 g, 4 °C, 15 мин) 50 мкг белка супернатанта денатурировали в буфере (50 mM трис-HCl, pH 6,8, 10 % глицерина, 100 mM 2-β-меркаптоэтанол, 1 % додецилсульфата натрия, 0,002 % бромфенолового синего; 5 мин при 95 °C), разделяли электрофорезом (система VE-2, Helicon, Россия) в 15 % -ом полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и переносили (Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories, США) на нитроцеллюлозную мембрану (Nitro, Франция). Эффективность переноса контролировали окрашиванием мембраны пунцовым S. Каспазу 3 и

актин выявляли поликлональными кроличьими антителами (Santa Cruz Biotechnology, США): первичными (H-277; 1:250) и (I-19-R; 1:1000) соответственно и вторичными, конъюгированными со щелочной фосфатазой, проявляли 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфатом (BCIP) и нитротетразолием голубым (NBT). Интенсивность сигналов для каспазы-3 и актина линейно зависели от количества нанесенного на гель общего белка. Уровень каспазы-3 оценивали относительно содержания в образце актина после сканирования мембран путем компьютерной денситометрии (Scion Image; Scion Corporation, США). Статистическая обработка данных денситометрии проведена на основе пакета программ STATISTICA. Влияние антисенса и клонидина оценено двухфакторным дисперсионным анализом (ANOVA), достоверность различий между группами устанавливали согласно апостериорному критерию Фишера.

Введение крысятам антисмыслового олигонуклеотида к альфа2A-адренорецепторам (антисенса) подавляло экспрессию гена-мишени. Происходило снижение как уровня мРНК рецептора, так и числа молекул рецепторных белков, определенного по специфическому связыванию [3H]RX821002 (Шишкина и др., 2003а, б; Shishkina *et al.*, 2004а, б). Снижение мРНК рецепторов во фронтальной коре достигало 42 % по сравнению с животными, которым в аналогичных условиях вводили контрольный олигонуклеотид или физиологический раствор (Шишкина и др., 2003а, б). Плотность альфа2-адренорецепторов в этом отделе мозга также снижалась на 29 %. Уменьшение экспрессии рецепторов, наблюдаемое во фронтальной коре, могло достигаться двумя путями: распространением вводимых препаратов до этого отдела и последующим угнетением синтеза постсинаптических рецепторов на месте и, кроме того, уменьшением поступления пресинаптических рецепторов из нейронов ствола мозга (Dygalov *et al.*, 2001, 2002).

Введение в мозг новорожденных крысят антисенса к альфа2A-адренорецепторам повышало уровни мРНК и белка ключевой исполнительской протеазы апоптоза каспазы 3 в коре их головного мозга (рис. 2). Матричная РНК каспа-

зы 3 более чувствительна к блокаде экспрессии аднерорецептора антисенсом, чем белок этого фермента. Если уровень мРНК был повышен почти вдвое у группы, получавшей антисенс и не подвергавшейся воздействию клонидином, то количество белка было увеличено лишь на треть. Стимулятор альфа2-аднерорецепторов клонидин в обеих использованных дозах сам по себе не оказывал существенного влияния на уровни мРНК и белка каспазы 3 у крысят, которым на 2–4-й дни жизни вводили контрольный олигонуклеотид или физиологический раствор. Вместе с тем заместительная терапия недостаточной экспрессии альфа2А-аднерорецепторов их стимулятором клонидином понижала повышенные в результате воздействия антисенсом уровни мРНК и белка каспазы 3. Так же, как и эффект антисенса, компенсирующее действие клонидина более выражено в отношении мРНК каспазы 3, уровень которой снижался в полтора раза. Содержание же белка этой протеазы у животных, получавших антисенс, на фоне клонидина лишь достигало значений, не отличающихся от уровня соответствующих контрольных групп.

Связь обнаруженных эффектов с подавле-

нием экспрессии гена-мишени подтверждается отсутствием таких изменений после воздействия контрольным олигонуклеотидом, а также возможностью компенсации недостаточной экспрессии альфа2-аднерорецепторов введением их стимулятора – клонидина. Фармакологическая верификация эффектов олигонуклеотида может быть легко проведена в отношении таких мишеней сиквенс-специфического подавления экспрессии, как гены рецепторов, для белков которых, как правило, имеются специфические низкомолекулярные стимуляторы, каковым для альфа2-аднерорецепторов является клонидин. Такая верификация не является избыточной, поскольку, как обсуждается в ряде обзоров, представленных в данном выпуске «Информационного вестника ВОГиС», в действии как одно-, так и двухцепочечных олигонуклеотидов, очевидно, могут присутствовать сиквенс-специфические эффекты, не связанные с подавлением экспрессии гена-мишени.

В целом представленные данные свидетельствуют об эффективности применения сиквенс-специфического угнетения экспрессии гена *in vivo* для выявления даже его «скрытых» функций, таких, как рассмотренная негативная

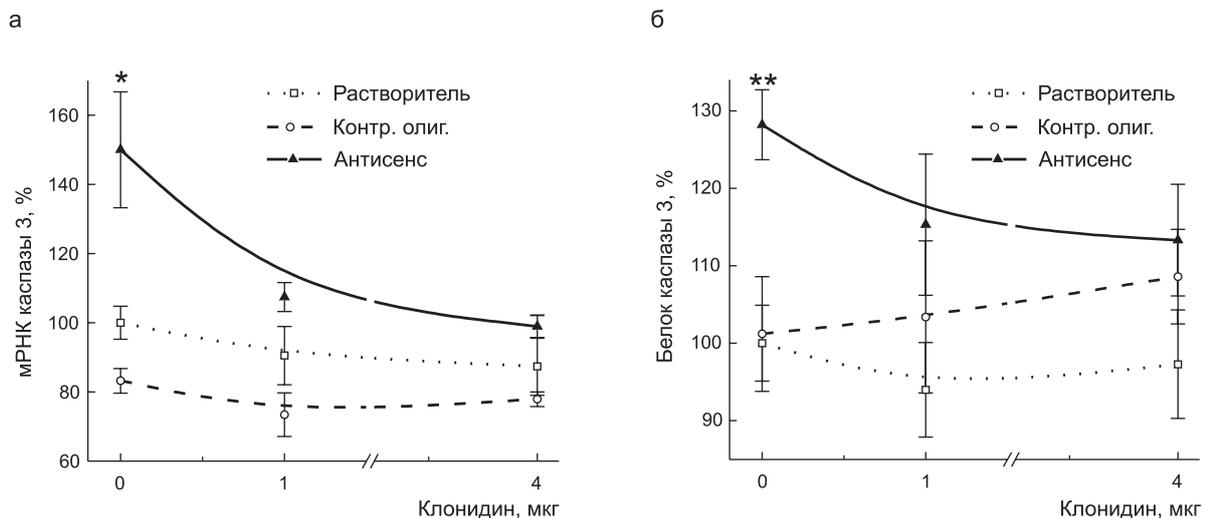


Рис. 2. Уровни мРНК (а) и белка (б) каспазы 3, оцененные относительно мРНК и белка бета-актина, в коре головного мозга 6-дневных крысят после введения им в мозг на 2–4-й дни жизни антисенса к альфа2А-аднеренергическому рецептору и компенсирующей фармакологической стимуляции этих рецепторов подкожным введением клонидина на 5-й день жизни.

Значения контрольной группы, получавшей лишь растворитель, приняты за 100 %. * $F(2,69) = 6,84$; $p < 0,002$; ** $F(2,37) = 6,42$; $p < 0,005$.

регуляция рецептором экспрессии протеазы, осуществляемая имеющимися рецепторными молекулами при взаимодействии с доступным эндогенным лигандом на максимальном уровне. Такая «скрытая» функция не выявляется прямым фармакологическим анализом (Dygalo *et al.*, 2004) и, как показано, ясно не проявляется в паттернах экспрессии рецептора и протеазы. Фармакологический контроль специфичности эффектов антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на рецепторные белки, способен, на наш взгляд, снизить вероятность ошибочной трактовки результатов сложных в применении *in vivo* сиквенс-специфических подходов современной функциональной геномики. Биологический смысл полученных результатов состоит в том, что обычные факторы раннего онтогенеза, такие, как стресс, терапия или качество материнской заботы, индуцирующие изменения в экспрессии нейрогена, способны влиять на процессы, определяющие гибель клеток в формирующемся головном мозге.

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

Литература

- Дыгало Н.Н., Юшкова А.А., Калинина Т.С. и др. Онтогенетические корреляции уровня норадреналина и плотности адренергических рецепторов в головном мозгу крыс // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 1. С. 53–56.
- Калинина Т.С., Баннова А.В., Дыгало Н.Н. Уровень мРНК фермента апоптоза – каспазы-3 в стволе и коре головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. Т. 131. № 8. С. 161–163.
- Шихкина Г.Т., Дыгало Н.Н., Калинина Т.С., Маснабиева Л.Б. Ген альфа2А-адренергического рецептора влияет на устойчивость крысят к холодовому наркозу // Докл. РАН. 2003а. Т. 388. С. 571–573.
- Шихкина Г.Т., Калинина Т.С., Маснабиева 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.
- Юшкова А.А., Дыгало Н.Н. Изменения числа альфа-2- и бета-адренорецепторов ствола и коры головного мозга крыс в онтогенезе // Российск. физиол. журнал им. И.М. Сеченова, 1995. Т. 81. № 2. С. 7–11.
- 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.
- Danneman P.J., Mandrell T.D. Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats // Lab. Anim. Sci. 1997. V. 47. P. 386–395.
- Dygalo 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.
- Dygalo N.N., Kalinina T.S., Sournina N.Y., Shishkina G.T. Effects of testosterone on alpha2A-adrenergic receptor expression in the rat brain // Psychoneuroendocrinology. 2002. V. 27. P. 585–592.
- Dygalo 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. 2004. V. 152. P. 225–231.
- Ferrer I., Bernet E., Soriano E. *et al.* Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes // Neuroscience. 1990. V. 39. P. 451–458.
- Gustafson I., Miyauchi Y., Wieloch T.W. Postischemic administration of idazoxan, an alpha-2 adrenergic receptor antagonist, decreases neuronal damage in the rat brain // J. Cereb. Blood Flow Metab. 1989. V. 9. P. 171–174.
- Gustafson I., Westerberg E., Wieloch T. Protection against ischemia-induced neuronal damage by the alpha 2-adrenoceptor antagonist idazoxan: influence of time of administration and possible mechanisms of action // J. Cereb. Blood Flow Metab. 1990. V. 10. P. 885–894.
- 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. Exp. 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.
- 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. P. 1–7.
- Laudenbach V., Mantz J., Lagercrantz H. *et al.* Effects of alpha2-adrenoceptor agonists on perinatal excitotoxic brain injury: comparison of clonidine and dexmedetomidine // Anesthesiology. 2002. V. 96. P. 134–141.
- Mansouri J., Panigrahy A., Assmann S.F., Kinney H.C.

- Distribution of alpha 2-adrenergic receptor binding in the developing human brain stem // *Pediatr. Dev. Pathol.* 2001. V. 4. P. 222–236.
- Martel J.-C., Chopin P., Colpaert F., Marien M. Neuroprotective effects of the α 2-adrenoceptor antagonists, (+)-efaroxan and (\pm)-idazoxan, against quinolinic acid-induced lesions of the rat striatum // *Exptl. Neurol.* 1998. V. 154. P. 595–601.
- Naqui S.Z., Harris B.S., Thomaidou D., Parnavelas J.G. The noradrenergic system influences the fate of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1999. V. 113. P. 75–82.
- Noh J.S., Kim E.Y., Kang J.S. *et al.* Neurotoxic and neuroprotective actions of catecholamines in cortical neurons // *Exptl. Neurol.* 1999. V. 159. P. 217–224.
- Nudel U., Zakut R., Shani M. *et al.* The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. P. 1759–1771.
- Pettmann B., Henderson C.E. Neuronal cell death // *Neuron.* 1998. V. 20. P. 633–647.
- Savitz S.I., Erhardt J.A., Anthony J.V. *et al.* The novel beta-blocker, carvedilol, provides neuroprotection in transient focal stroke // *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* 2000. V. 20. P. 1197–1204.
- 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. P. 1285–1292.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Attenuation of α 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.
- Suzuki Y., Farbman A.I. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in olfactory epithelium *in vitro*: possible roles of caspase 1 (ICE), caspase 2 (ICH-1), and caspase 3 (CPP32) // *Exptl. Neurol.* 2000. V. 165. P. 35–45.
- Wang R.X., Limbird L.E. Distribution of mRNA encoding three alpha2-adrenergic receptor subtypes in the developing mouse embryo suggests a role for the alpha 2A subtype in apoptosis // *Mol. Pharmacol.* 1997. V. 52. P. 1071–1080.
- Winzer-Serhan U.H., Raymon H.K., Broide R.S. *et al.* Expression of alpha 2 adrenoceptors during rat brain development-I. Alpha 2A messenger RNA expression // *Neuroscience.* 1997. V. 76. P. 241–260.
- Yuan S.Z., Runold M., Hagberg H. *et al.* Hypoxic-ischaemic brain damage in immature rats: effects of adrenoceptor modulation // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2001. V. 5. P. 29–35.
- Zhu H., McElwee-Witmer S., Perrone M. *et al.* Phenylephrine protects neonatal rat cardiomyocytes from hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis // *Cell Death Differ.* 2000. V. 7. P. 73–784.

ANTISENSE-BASED TECHNOLOGY FOR UNRAVELING OF NEUROTRANSMITTER RECEPTOR GENE «HIDDEN» FUNCTION IN REGULATION OF APOPTOSIS IN THE DEVELOPING BRAIN

**P.N. Menshanov, A.V. Bannova, Ph.A. Il'inykh, G.T. Shishkina,
T.S. Kalinina, N.N. Dygalo**

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

Summary

An example of *in vivo* sequence-specific gene expression suppression for unraveling of its «hidden» function is presented. The control of antisense oligonucleotids effects' specificity by drug administration was evaluated. It was found that alpha-2-adrenoreceptors had an impact on the expression of the key apoptotic gene – caspase-3 – in the mammalian brain during the critical period of its development. mRNA and protein levels of caspase-3, determined by RT-PCR and immunoblot accordingly, were increased in the neonatal rat's cortex after administration of the antisense oligonucleotid to alpha-2-adrenoreceptors. Interrelation between antisense administration and target gene expression suppression was confirmed by absense of changes in mRNA and protein levels of caspase-3 after control oligonucleotid administration and by clonidine-induced compensation of alpha-2-adrenoreceptor's expression decrease after antisense administration.