

## ДИЗАЙН АНТИСЕНС-ОЛІГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДІВ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ ТРАНСЛЯЦІЇ мРНК ГЕНУ *Prnp*

В. В. Стадник, Х. Я. Майор, Л. А. Ізюмова

Інститут біології тварин УААН

У статті представлено результати дизайну антисенс-олігодезоксирибонуклеотидів до мРНК гену фізіологічного пріона. Встановлено нуклеотидні послідовності трьох антисенс-олігодезоксирибонуклеотидів, комплементарних до 5'-ділянки, зони стартового кодону та середини відкритої рамки зчитування мРНК гену *Prnp*.

Група захворювань, об'єднаних під назвою трансмісивних спонгіформних енцефалопатій (ТСЕ) або пріонних інфекцій, включає в себе фатальні нейродегенеративні інфекційні хвороби тварин та людини [1]. Основними ознаками ТСЕ є білкова природа інфекційного агента, ураження центральної нервової системи, яке у більшості випадків супроводжується вакуолізацією тканин головного мозку, неврологічні симптоми та 100 %-а летальність [1, 2]. Незважаючи на значну кількість досліджень у галузі біології пріонів, досі не отримано ліків та ефективних профілактичних засобів ТСЕ. Можливо, це зумовлено деякою вузкістю вектору досліджень у цій галузі, оскільки більшість дослідників зосереджені на пошуку сполук, які впливатимуть безпосередньо на патологічний пріон [3]. В той же час, пошук методів впливу на клітинний пріон, який є необхідним компонентом для розвитку інфекції, практично не проводиться. Лише останнім часом з'явилися роботи з пошуку сполук, спрямованих на зниження рівня фізіологічного пріона [4].

Також у літературі відсутні дані про застосування антисенс-олігодезоксирибонуклеотидів (асОДН) для інгібування трансляції мРНК фізіологічного пріону. Є лише одна робота, у якій фосфооротіатні ОДН застосовувалися для зниження рівня патологічного пріона, тобто їх активність була спрямована на білок, а не на мРНК [5].

Тому було вирішено провести пошук асОДН, які могли би застосовуватися для зниження трнсляційної активності мРНК гену *Prnp*. Це, в майбутньому, може бути використано для розробки засобів лікування пріонних інфецій на основі асОДН.

**Матеріали і методи.** Для досліджень використовували послідовність мРНК гену *Prnp* виду *Rattus norvegicus*, отриману з бази даних *NCBI*. Аналіз вторинної структури мРНК здійснювали за алгоритмом *Zucker*, з використанням програми *mfold v.2.0*. Можливості утворення утворення димерів та петель асОДН виявляли у програмі *Gene Runner v.3.05*.

**Результати та обговорення.** Для ефективного інгібування мРНК гену фізіологічного пріона було вирішено підібрати асОДН для ділянок 5'-нетрансляючого регіону (5'-НТР), стартового кодону та середини кодуєчої рамки гену. Перші два асОДН дозволяють блокувати трансляцію мРНК пріону двома шляхами — стеричним блокуванням цього процесу та запуском РНКазы Н-опосередкованого гідролізу мРНК. Третій асОДН діє лише шляхом активації РНКазы Н, але за рахунок його локалізації всередині відкритої рамки зчитування, ця активація є ефективнішою, порівняно з двома першими асОДН.

Аналіз вторинних структур мРНК пріону дозволив побудувати послідовності ряду асОДН (ССААGGTTCGCCATGAT, АGТАGССААGGTTCGCCAT, ААСТТТТТАТАТGАСАА, ТСТGCTGCTCTGАСААСGС, АТGCTTGAGGTTGGTT-), які є комплементарними до цільових ділянок мРНК, які, при цьому розташовувалися у зоні петель мРНК (рис. 1).

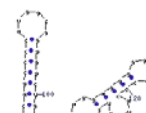
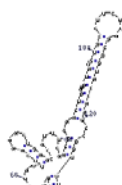




Рис.1. Приклади вторинної структури досліджуваних ділянок мРНК гену *Prnp* (стрілками відмічено локалізацію сайтів, комплементарних до відібраних асОДН).

Подальший аналіз відібраних асОДН дозволив встановити, що два з них здатні утворювати димери (рис. 2), що може значно знижувати їх активність *in vivo*.

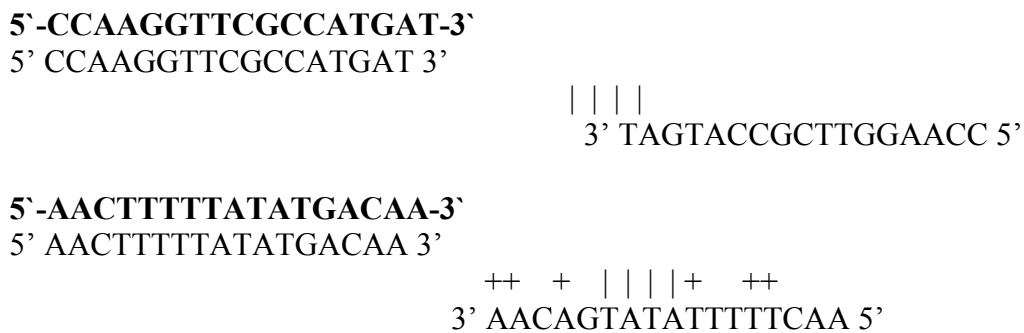


Рис.2. Схема утворення димерів окремими асОДН до мРНК гену фізіологічного пріона.

Таким чином, лише три асОДН відповідають всім вимогам для ефективного пригнічення трансляції мРНК гену *Prnp*. Це асОДН TCTGCTGCTCTGACAACGC, комплементарний до кеп-ділянки мРНК, AGTAGCCAAGGTTGCGCCAT, що охоплює старт-кодон та ATGCTTGAGGTTGGTT, здатний зв'язуватися з центральною ділянкою відкритої рамки зчитування мРНК пріону.

## ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень встановлено послідовності асОДН, які можуть використовуватися для інгібування трансляції мРНК гену *Prnp*.

## DESIGN OF ANTISENS OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES FOR INHIBITION OF PRION PROTEIN mRNA TRANSLATION

*V.V. Stadnyk, Ch.Ya. Mayor, L. A. Izyumova*

## SUMMARY

The results of antisens oligodeoxyribonucleotides design to cellular prion protein mRNA are presented in this article. The nucleotide sequences of three antisens oligodeoxyribo-nucleotides, which are complementary to 5-cap, area of start-codon and middle of the opened reading frame of prion protein mRNA were determined.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Prusiner S.* Prions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — № 95. — P.13363–13383.
2. A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy / Wilesmith J. W., Wells G. A. H., Ryan J. B. M. et al. — 1997. — Vet. Rec. — Vol. 141. — P. 239–243.
3. *Trevitt C. R., Collinge J. A.* Systematic review of prion therapeutics in experimental models // Brain. — 2006. — Vol. 129. — P. 2241–2265.
4. *Стадник В. В.* Експресія фізіологічного пріону у головному мозку ссавців за дії глікозаміногліканів // Біологія тварин. — 2007. — Т. 9. — № 1–2. — С. 141–145.
5. Phosphorothioate Oligonucleotides Reduce PrPSc Levels and Prion Infectivity in Cultured Cells / Karpuj M. V. Giles K., Gelibter-Niv S. et al. // Molmed. — 2007. — Vol. 13 (3–4). — P. 190–198.