

УДК 577.21 : 579.23"315

# Сравнение эффективности подавления функциональной активности целевых генов с помощью синтетических модифицированных siРНК и shРНК, экспрессируемых рекомбинантными лентивирусными векторами

П.В. Спири<sup>1</sup>, Д. Баскаран<sup>1</sup>, П.М. Рубцов<sup>1</sup>, М.А. Зенкова<sup>2</sup>, В.В. Власов<sup>2</sup>, Е.Л. Черноловская<sup>2</sup>, В.С. Прасолов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

\*E-mail: prasolov@eimb.ru

**РЕФЕРАТ** РНК-интерференция является эффективным природным механизмом модуляции экспрессии генов на посттрансляционном уровне, выявленным как у высших эукариотических организмов животного и растительного происхождения, так и у низших эукариот и вирусов.

В настоящее время РНК-интерференция используется в качестве мощного инструмента исследования функциональной активности генов, с помощью которого получены результаты, представляющие существенный интерес для многих областей фундаментальной биологии. Наряду с этим во многих ведущих лабораториях мира ведутся биомедицинские разработки, нацеленные на создание терапевтических средств нового поколения для лечения наследственных, злокачественных и инфекционных заболеваний различной этиологии, основанных на использовании интерферирующих РНК.

Одной из основных проблем этих работ является поиск эффективных методов доставки интерферирующих РНК в клетки-мишени. В настоящее время для внесения в клетки интерферирующих РНК используют трансфекцию или трансдукцию с помощью вирусных векторов, направляющих в клетках синтез shРНК – предшественников соответствующих siРНК.

В представленной статье приведены результаты сравнения эффективности подавления экспрессии онкогена AML1-ETO с помощью липофекции синтетической siРНК и при использовании лентивирусного вектора, направляющего синтез shРНК – предшественник анти AML1- ETO siРНК.

**Ключевые слова:** ленти- и ретровирусные векторы, РНК интерференция, эмбриональные фибробласты мыши.

**Список сокращений:** AML – Acute Myeloid Leukemia (острый миелоидный лейкоз), CBF – Core Binding Factor (гетеродимерный транскрипционный комплекс), EGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein (усиленный зеленый флуоресцирующий белок), GTU – GFP Transducing Units (GFP трансдуцирующие единицы), HDAC – Histone deacetylase (гистоновая деацетилаза), IRES – Internal Ribosome Entry Site (участок внутренней посадки рибосомы), NHR – Nervy Homology Region (область гомологичная белку Nervy), RHD – Runt Homology Domain (домен гомологичный белку Runt), VSV-G – Vesicular stomatitis virus G glycoprotein (белок G вируса везикулярного стоматита).

## ВВЕДЕНИЕ

Контролируемое выключение экспрессии определенных генов представляет значительный интерес для многих направлений фундаментальной молекулярной биологии и прикладных ее областей, в первую очередь для современной биомедицины [1].

Среди разнообразных подходов, применяемых для подавления экспрессии генов (таких как использование антисмысловых нуклеотидов, рибозимов, химических блокаторов, разрушение функциональной активности определенного гена путем внесения соответствующих мутаций в зиготу), наиболее эффективным в настоящее время

является метод, в основе которого лежит механизм РНК-интерференции [2, 3, 4].

Интерференция РНК – это высокоспецифичный механизм подавления экспрессии гена на посттранскрипционном уровне за счет деградации кодируемой этим геном мРНК. Деградация мРНК происходит в результате ее связывания с комплексом, содержащим малую интерферирующую РНК (siРНК), комплементарную нуклеотидным последовательностям этой мРНК, и клеточные белки, в т.ч. эндонуклеазы. [1]

Использование siРНК уже несколько лет с успехом применяется в молекулярной биологии и в биомедицине для изучения функций генов и их взаимодействий, а также с целью создания терапевтических средств нового поколения. Возможно, в будущем siРНК найдут применение в медицине для лечения вирусных и онкологических заболеваний.

Для подавления функциональной активности генов млекопитающих в настоящее время широко используют короткие синтетические двуцепочечные молекулы siРНК длиной 21–22 п.н. [5]. Существует ряд коммерческих фирм, производящих siРНК. На интернет-сайтах этих производителей представлены программы для дизайна siРНК (например, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)). Перенос синтезированных *in vitro* siРНК в клетки обычно осуществляют с помощью трансфекции с использованием искусственных мембран. Эффект интерференции РНК проявляется не сразу после трансфекции клеток, т.к. siРНК индуцирует деградацию мРНК, но не кодируемого ей белка. Обычно эффект развивается в течение 18 ч, однако в случае стабильных белков это время может увеличиваться до 24 ч и даже до 48 ч. Действие siРНК сравнительно непродолжительно и по разным сведениям сохраняется в течение 3–5 клеточных делений [1]. Следует отметить, что продолжительность действия siРНК может зависеть от многих факторов, в частности от природы трансфицируемых клеток. Были разработаны подходы для модификации синтезированных siРНК, что позволяет в некоторых случаях довольно существенно продлить время действия siРНК в клетках и перекрыть время жизни стабильных белков [2].

С целью создания длительного эффекта РНК-интерференции в отношении определенного гена используют ленти- и ретровирусные векторы, в которых стандартными генно-инженерными методами могут быть проклонированы нуклеотидные последовательности, кодирующие смысловую и антисмысловую цепи siРНК, разделенные спейсером, расположенным между ними. Транскрипция такой матрицы приводит к образованию в клетке молекул малых шпилечных РНК, представляющих собой две самокомплементарные цепи, разделенные петлей спейсера. Установлено, что после транскрипции петля, соединяющая две комплементарные последовательности малой шпилечной РНК, отрезается в результате действия внутриклеточного белка Dicer, что, в конечном счете, приводит к образованию специфической siРНК, инициирующей деградацию мРНК гена, подавление активности которого было необходимо осуществить [6].

В рамках данной работы нами с помощью РНК-интерференции было осуществлено подавление экспрессии активированных онкогенов AML1-ETO(t8;21)

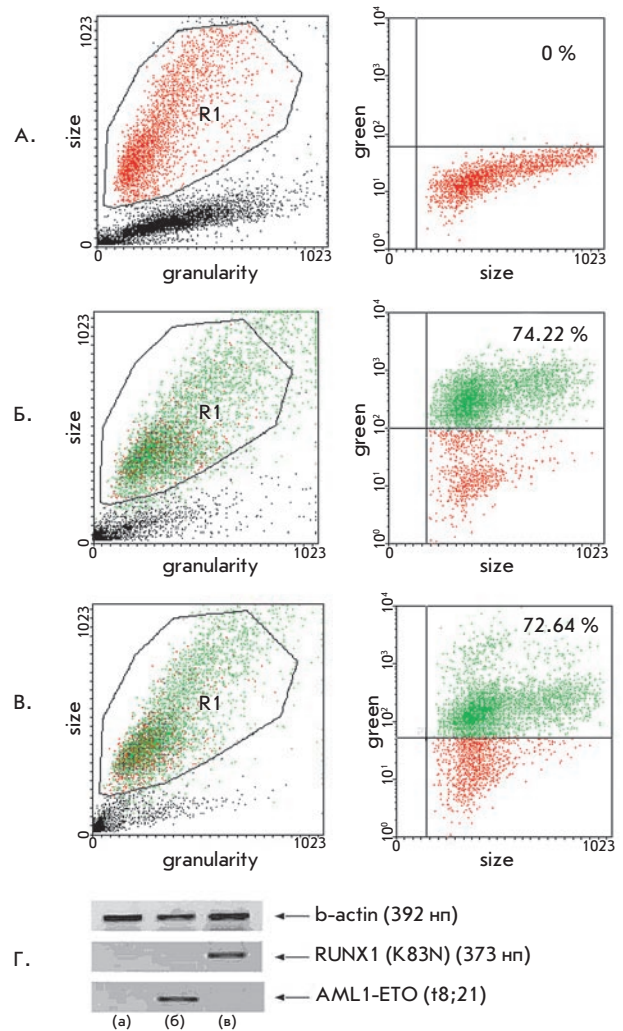


Рис. 1. Эффективность экспрессии трансгенов в клеточных линиях, трансдуцированных рекомбинантными ретровирусными векторами, содержащими гены AML1-ETO и RUNX1-K83N. Гистограммы отображают процент флуоресцирующих клеток в популяциях: а – исходных не трансдуцированных фибробластов линии SC-1; б – фибробластов линии SC-1, трансдуцированных ретровирусными векторами, экспрессирующими онкоген RUNX1-K83N (флуоресценция регистрируется в 74.22 % популяции); в – фибробластов линии SC-1, трансдуцированных ретровирусными векторами, экспрессирующими слитный онкоген AML1-ETO (флуоресценция регистрируется в 72.64 % популяции). Ось X характеризует размер анализируемых частиц (клеток) в абсолютных значениях, ось Y – значение интенсивности флуоресценции частиц (клеток) в абсолютных значениях. Каждая третья гистограмма в ряду разделена на квадранты, правый верхний из которых включает клетки, экспрессирующие EGFP и соответственно AML1-ETO, правый нижний квадрат характеризует клетки, не экспрессирующие EGFP и соответственно онкоген AML1-ETO; г – электрофоретическая картина продуктов ОТ-ПЦР (слева направо): (а) нетрансдуцированные клетки линии SC-1, (б) клетки линии SC-1, трансдуцированные ретровирусными векторами, экспрессирующими RUNX1-K83N, (в) клетки линии SC-1, трансдуцированные ретровирусными векторами, экспрессирующими AML1-ETO

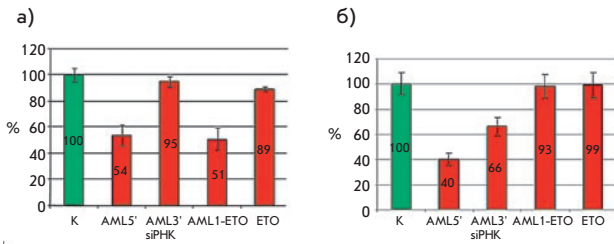


Рис. 2. Результаты измерений, полученных при анализе клеточных суспензий. Представлена зависимость процента флуоресцирующих клеток от трансфицированной в них siРНК: а – процент флуоресцирующих клеток в популяции трансгенных эмбриональных фибробластов мыши, несущих в своем геноме активированный онкоген AML1-ETO через 48 ч после трансфекции их siРНК, комплементарных разным участкам мРНК онкогена; б – процент флуоресцирующих клеток в популяции трансгенных эмбриональных фибробластов мыши, несущих в своем геноме активированный онкоген RUNX1(K83N) через 48 ч после трансфекции их siРНК, комплементарных разным участкам мРНК онкогена

и RUNX1(K83N) – мутантных генов, с высокой частотой выявляемых при острых миелоидных лейкозах [7, 8].

Эта работа позволила провести сравнение эффективности сайленсинга, осуществляемого после введения в модельные клетки, несущие активированный лейкозный онкоген, а) синтетических модифицированных двуцепочечных siРНК методом липофекции и б) после трансдукции модельных клеток рекомбинантными лентивирусными векторами, РНК-геном которых кодирует предшественники шпилечных shРНК.

Для этого использовали модельные клетки, полученные путем трансдукции эмбриональных фибробластов мыши линии SC1 с помощью ретровирусных векторов, несущих в своем составе экспрессирующую кассету: промотор-целевой ген-IRE5 – маркерный ген (EGFP). В качестве целевых генов были использованы слитный онкоген AML1-ETO, возникший в результате хромосомной перестройки t(8:21) или онкоген RUNX1 (K83N), активированный в результате точечной мутации, приводящей к замене в кодируемом онкобелке аминокислоты лизина на аспаргин в 83-м положении. Целевой ген и маркерный ген зеленого белка (EGFP) находятся под общим промотором. Благодаря использованию такой экспрессирующей кассеты по внутриклеточному содержанию маркерного гена EGFP можно судить об экспрессии целевого гена.

Типичные результаты оценки эффективности трансдукции и последующей экспрессии трансгенов приведены на рис. 1.

В работе были использованы исходные фибробласты эмбриона мыши линии SC1, трансгенные клетки линии SC1, несущие в своем геноме трансдуцированные активированные онкогены AML1-ETO или RUNX1(K83N), и клетки почки эмбриона человека линии HEK 293. Клетки всех четырех линий росли на стандартной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4мМ L-глутамина, 1мМ пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл

и 100 ед./мл соответственно, при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

Дизайн и синтез двуцепочечных siРНК был осуществлен совместно с сотрудниками Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Олигонуклеотиды синтезированы в ИХБФМ СО РАН с помощью фосфитамидного метода с дальнейшей их модификацией метилированием в определенных положениях, с использованием оригинальной методики, которая позволяет существенно увеличивать срок жизни синтетических siРНК в клетке [2]. Последовательности siРНК олигонуклеотидов и схема, показывающая к каким участкам онкогенов они подбирались, приведены в табл.

Перенос siРНК-дуплексов анти-AML1-ETO и анти-RUNX1 в трансгенные клетки линии SC1, несущие соответствующие активированные онкогены, осуществляли методом липофекции с помощью реагента Lipofectamin2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Конечная концентрация siРНК дуплексов в культуральной среде составляла 200 нМ.

Через 4 ч в трансфицированных клетках среду меняли на свежую и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 ч.

Анализ уровня экспрессии активированных онкогенов осуществляли методом ОТ-ПЦР и методом проточной цитофлуориметрии. Тотальную мРНК из клеточных культур выделяли с помощью тризола (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Полученную мРНК использовали для построения первых цепей кДНК с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega).

Для идентификации в полученной тотальной кДНК нуклеотидных последовательностей исследуемых генов применяли метод ПЦР с праймерами, специфичными к данному гену. Для RUNX1(K83N) использовали праймеры: сенс-AGTCCTACCAATACCTGGGA; антисенс-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG. Для AML1/ETO: сенс-CATTTACCCGAGATAGAG; антисенс-AAGTCCTCGGCGTCACTGAT. Определение уровня экспрессии маркерного гена зеленого флуоресцентного белка EGFP, входящего в состав экспрессирующих кассет, встроенных в геном клеток обеих линий трансгенных клеток, проводили с использованием праймеров: сенс-ACCTACGGCCTGCAGTGCTT; антисенс-TGCCGTTCTTCTGCTTGTCTCG. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1.5 %-ном геле агарозы, обработку результатов проводили с помощью про-

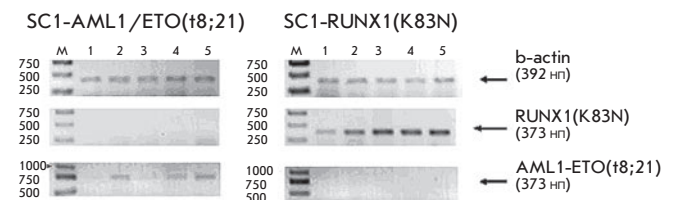


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР после добавления siРНК: 1. siРНК (AML1-5'), 2. siРНК (AML1-3'), 3. siРНК (AML1-ETO), 4. siРНК (ETO), 5. Контроль (без siРНК). Справа указаны размеры продукта ПЦР в парах оснований



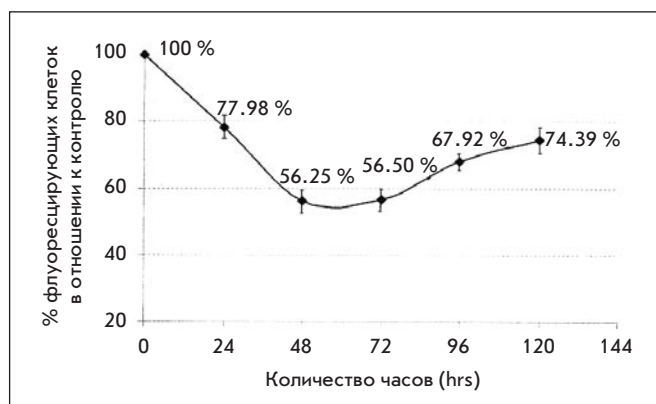


Рис. 4. Кинетика действия siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ETO в онкогене AML1-ETO(t8;21)

граммного обеспечения Gel-Pro Analyzer 4.0, в результате для каждой лунки были получены значения максимальной оптической плотности (maxOD). Полученные значения были нормализованы по β-актину.

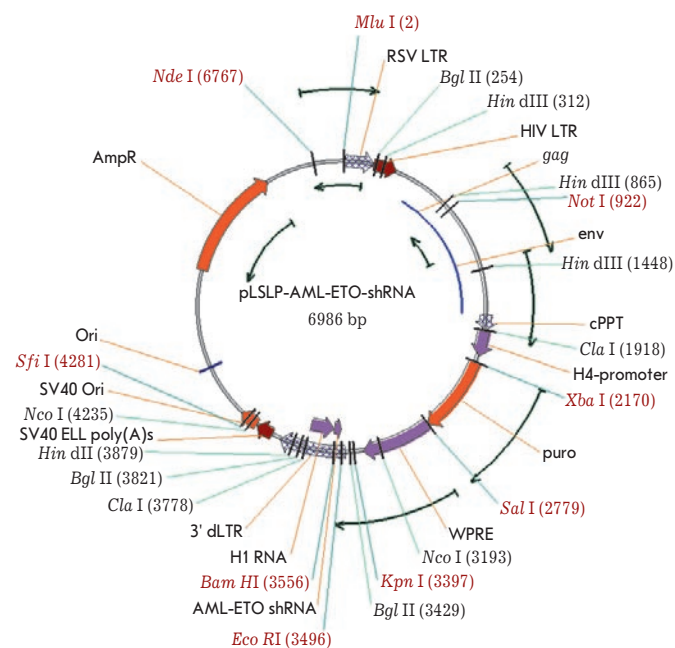
Измерение флуоресценции клеток проводили на проточном цито-флуориметре Epics 4XL Beckman Coulter (США). Сбор и учет данных производили с помощью программного обеспечения WinMDI, версия 2.8.

На рис. 2 представлены диаграммы величины флуоресценции клеток, полученные методом проточной цитофлуориметрии. По оси X – популяции клеток, трансфицированных siРНК, по оси Y – процент флуоресцирующих клеток в популяции.

Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, хорошо согласуются с результатами, полученными методом ОТ-ПЦР. На рис. 3 представлены электрофореграммы продуктов ОТ-ПЦР после добавления siРНК. Видно, что в популяции трансгенных клеток, SC-1-AML1/ETO(t8;21) при добавлении siРНК, комплементарной участку онкогена в месте слияния генов AML1 и ETO, AML5'-концевому участку и к участку ETO (табл.), наблюдается снижение уровня содержания соответствующих мРНК. В популяции SC-1-RUNX1(K83N) снижение экспрессии происходит при добавлении siРНК, комплементарной участкам, ближайшим к AML-5'-концу, общему для обоих трансгенов, и участку, близкому к AML-3' концу, который присутствует только в трансгене RUNX1(K83N).

Как видно из рис. 2, в части популяции клеток линий, экспрессирующих онкоген, наблюдается значительное гашение флуоресценции (в 2 и более раз) после добавления синтетической siРНК, в то время как в другой части этой популяции флуоресценция гасится не так значительно. Это совпадает с данными ОТ-ПЦР, представленными на рис. 3. Наиболее вероятной причиной такого явления может быть недостаточно высокая эффективность доставки синтетических siРНК в клетки. В случае трансфекции siРНК, по оценке фирмы-производителя реагента (Invitrogen), используемого для трансфекции в данном эксперименте, эффективность переноса составляет около 50–60 % и зависит от природы используемых клеток. Кроме этого, снижение активности синтетических siРНК может быть связано с их

А.



Б.

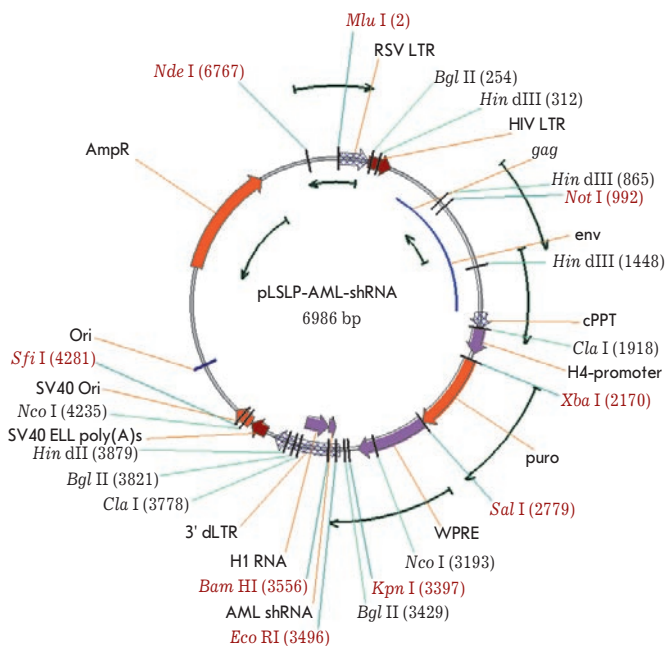


Рис. 5. Lentivirальные векторы, экспрессирующие shRNA: а – pLSLP-AML-ETO-shRNA: лентивирусный вектор, экспрессирующий shРНК – предшественник siРНК, комплементарной мРНК онкогена AML1-ETO в месте слияния генов AML1 и ETO; б – pLSLP-AML-shRNA: лентивирусный вектор, экспрессирующий shRNA – предшественник siРНК, комплементарной 5' концевой области мРНК гена RUNX1

деградацией под действием клеточных эндонуклеаз, несмотря на значительный вклад модификаций, вносимых в последовательности синтетических siРНК, обеспечивающих их относительную стабильность. По нашим данным, наибольшая интерферирующая активность синтетических модифицированных siРНК наблюдается через 48 и 72 ч.

На рис. 4 приведен график, на котором представлена кинетика действия siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ETO в онкогене AML1-ETO(t8;21). За начальную точку отсчета приняли момент внесения siРНК.

Показано, что максимальное действие использованной siРНК наблюдается через 48 и 72 ч после трансфекции, когда доля флуоресцирующих клеток в популяции составляет около 56 %. Через 96 и 120 ч процент флуоресцирующих клеток составляет уже 67.92 и 74.39 соответственно. Результаты приведены в отношении к контролю, представлены средние значения из трех параллельных измерений.

Увеличение эффективности РНК-интерференции может быть достигнуто за счет увеличения эффективности внесения интерферирующей РНК в модельные клетки.

Для этого, с учетом структуры эффективно действующей siРНК, нами были сконструированы лентивирусные векторы, геном которых содержал последовательности, направляющие синтез shРНК-шпилек-предшественников siРНК.

Основой для таких генетических конструкций послужил лентивирусный вектор pLSLP, в который вводили последовательность ДНК, кодирующую shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарную месту слияния генов AML1 и ETO или части гена RUNX1, общей с онкогеном AML1/ETO.

Последовательности ДНК,  
кодирующие анти-AML-ETO shРНК  
AML-ETO-сенс

5'-p-gatccgCCTCGAAATCGTACTGAGGcttctgtcaTCT-  
CAGTACGATTTTCGAGGtttttg-3'

AML-ETO-антисенс

5'-p-aattcaaaaaCCTCGAAATCGTACTGAGAtgacag-  
gaagCCTCAGTACGATTTTCGAGGcg-3'

Последовательности ДНК,  
кодирующие анти-RUNX1 shРНК  
AML-5-сенс

5'-p-gatccgGAACCAGGTTGCAAGATTCcttctgt-  
caAAATCTTGCAACCTGGTTCtttttg-3'

AML-5-антисенс

5'-p-aattcaaaaaGAACCAGGTTGCAAGATTTtgacag-  
gaagGAATCTTGCAACCTGGTTCcg-3'

Дизайн последовательностей осуществлялся с помощью интернет ресурса [http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA\\_scales/index.html](http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales/index.html). Клонирование проводилось с помощью стандартных методов генной инженерии. На рис. 5 представлены карты рестрикции сконструированных лентивирусных векторов, несущих шпилечные структуры.

Для получения лентивирусных вирионов, несущих в своем геноме shРНК шпильку, ДНК рекомбинантных лентивирусных векторов вводили в клетки линии 293Т методом ко-трансфекции с упаковывающими плазмидами, с помо-

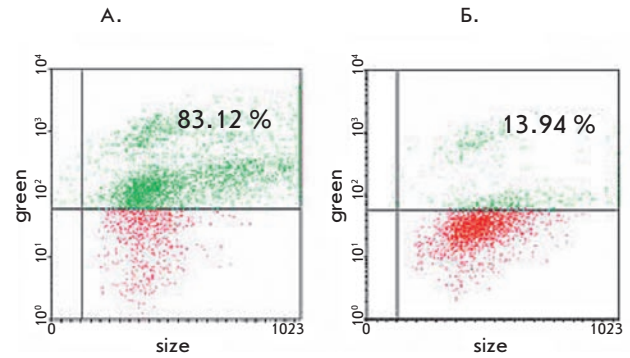


Рис. 6. Диаграмма, показывающая изменение количества флуоресцирующих клеток в популяции линии фибробластов мыши SC-1-AML1/ETO(t8;21), экспрессирующих AML1-ETO: а – до трансдукции лентивирусным вектором и б – после трансдукции лентивирусным вектором, экспрессирующим shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарную мРНК онкогена AML1-ETO в месте слияния генов AML1 и ETO

щью реагента Lipofectamin 2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Вирусные стоки собирали в течение трех дней и использовали для заражения трансгенных клеток, несущих активированные онкогены AML1-ETO и RUNX1(K83N), как описано ранее [9]. Через 48 ч после заражения клетки помещали в селективную среду с антибиотиком пурамицином (5 дней, 10 мкг/мл). Полученную в результате селекции массовую культуру трансгенных

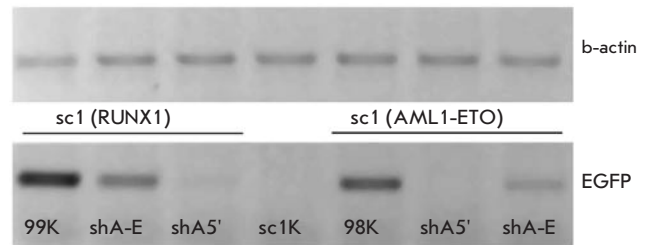


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР, полученная в результате анализа экспрессии активированных онкогенов в линиях трансгенных клеток SC1-AML1/ETO(t8;21) и SC1-RUNX1(K83N), трансдуцированных рекомбинантными лентивирусными векторами, несущими в своем геноме shРНК шпильки-предшественники соответствующих siРНК: 99K – контрольный образец из культуры клеток SC1-RUNX1(K83N), не трансдуцированной лентивирусным вектором; shA-E – продукт анализа образца мРНК из культуры клеток SC1-RUNX1(K83N), трансдуцированной рекомбинантным лентивирусом, несущим шпильку-предшественник siРНК, комплементарной месту слияния AML1 и ETO; shA5' – продукт анализа мРНК из культуры клеток SC1-RUNX1(K83N), трансдуцированной рекомбинантным лентивирусом, несущим шпильку-предшественник siРНК, комплементарной к 5' концевому участку гена AML1; sc1K – контрольный образец из культуры клеток линии SC1, не несущей трансгена и не трансдуцированной рекомбинантным лентивирусным вектором. Последние три образца – результат анализа трансгенных культур клеток SC1-AML1/ETO(t8;21), первый из которых – соответствующий контроль, а каждая из последних двух трансдуцированных соответствующими лентивирусными конструктами

клеток, несущих ген, кодирующий shРНК шпильку, исследовали методом проточной цитофлуориметрии и ОТ-ПЦР.

На рис. 6 представлены гистограммы, из которых следует, что процент флуоресцирующих трансгенных клеток SC1-AML1/ЕТО(t8;21) после трансдукции их ДНК лентивирусного вектора, несущего в своем геноме shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ЕТО, снижается в 6 раз. Соответствующие результаты были получены при анализе трансгенных клеток линии SC1-AML1/ЕТО(t8;21) и SC1-RUNX1(K83N) после трансдукции их лентивирусной конструкцией, несущей в своем геноме shРНК шпильку-предшественник siРНК, комплементарной месту слияния генов AML1 и ЕТО, на изменение процента флуоресцирующих клеток не повлияло (гистограмма не представлена). Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, соотносятся с результатами анализа методом ОТ-ПЦР. Электрофореграмма представлена на рис. 7.

### ВЫВОДЫ

Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют о высокой эффективности стабильных синтетических модифицированных siРНК, используемых для подавления экспрессии активированных онкогенов, с высокой частотой выявляемых при острых миелоидных лейкозах.

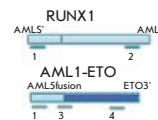
Данные, полученные в опытах с синтетическими siРНК, позволили осуществить дизайн и синтез ДНК-последовательностей, предшественников shРНК, которые были клонированы в лентивирусный рекомбинантный вектор. С помощью лентивирусных векторов ДНК-последовательности, направляющие постоянный внутриклеточный синтез shРНК шпилек-предшественников siРНК, комплементарных к различным участкам активированных онкогенов AML1/ЕТО(t8;21) и RUNX1(K83N), были внесены в трансгенные клетки, несущие в своем геноме эти

Таблица

Мишень	Цепь	Последовательность
AML-ЕТО	sense	5'-CCUCGAAAUCGUmACUmGAGUAG-3'
	antisense	5'-UCUCmAGUmACGAUUUCGAGGUU-3'
ЕТО	sense	5'-GGCCmAGCGGUmACmAGUCmAGAU-3'
	antisense	5'-UUmGGACUmGUmACCGCmGGCCUG-3'
AML (5')	sense	5'-GAACCmAGGUUmGCmAAGAUUGAA-3'
	antisense	5'-AAAUCUUmGCmAACCUmGGUUCUU-3'
AML (3')	sense	5'-AGCCCGGGAGCUUmGUCCUCUU-3'
	antisense	5'-AAGGACmAAGCUCCCGGGCUUmG-3'

### siРНК

1. AML5'
2. AML3'
3. AML1-ЕТО
4. ЕТО



онкогены. Анализ трансдуцированных лентивирусными векторами трансгенных клеток методом проточной цитофлуориметрии и ОТ-ПЦР показал значительное снижение уровня экспрессии активированных онкогенов. Это свидетельствует о значительной эффективности сконструированных нами лентивирусных конструкций, которые можно использовать для подавления экспрессии целевых генов методом РНК-интерференции.

Авторы приносят глубокую благодарность профессору П.М. Чумакову за предоставленный ретровирусный вектор для клонирования последовательностей, направляющих синтез shРНК. ●

*Работа выполнена в рамках проекта по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и проекта по программе фундаментальных исследований Президиума РАН № 27 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 годы" (ГК 02.512.11.2200 и ГК 02.512.11.2294).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вильгельм А.Э., Чумаков С.П., Прасолов В.С. // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 3. С. 1–18.
2. Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., et al. // Oligonucleotides. 2009. Jun;19(2):191-202.
3. Shuey D.J., McCallus D.E., Giordano T. // Drug Discov. Today. 20027. 1040–1046.
4. Stanisławska J., Olszewski W.L. // Arch. Immunol. Ther. Exp. 200553. 39–46.

5. Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. // Methods. 200226. 199–213.
6. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. // Science. 2002296. 550–553.
7. Satake N., Maseki N., Kozu T., et al. // British Journ. of Haemat. 199591: 892–898.
8. Peterson L.F., Zhang D.E. // Oncogene. 2004; 23(24):4255–62.
9. Kravchenko J.E., Ilyinskaya G.V., Komarov P.G., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Apr 29;105(17):6302-7.