Практическое применение РНК-интерференции

- Функциональная геномика
- Медицина
- Биотехнология

Функциональная геномика

- Библиотеки РНК-интерференции
- Скрининг геномов

Картирование и аннотация генов у растений

- Образец текста
  - Второй уровень
    - Третий уровень
      - Четвертый уровень
        - Пятый уровень

Преимущества нокдауна перед нокаутом:

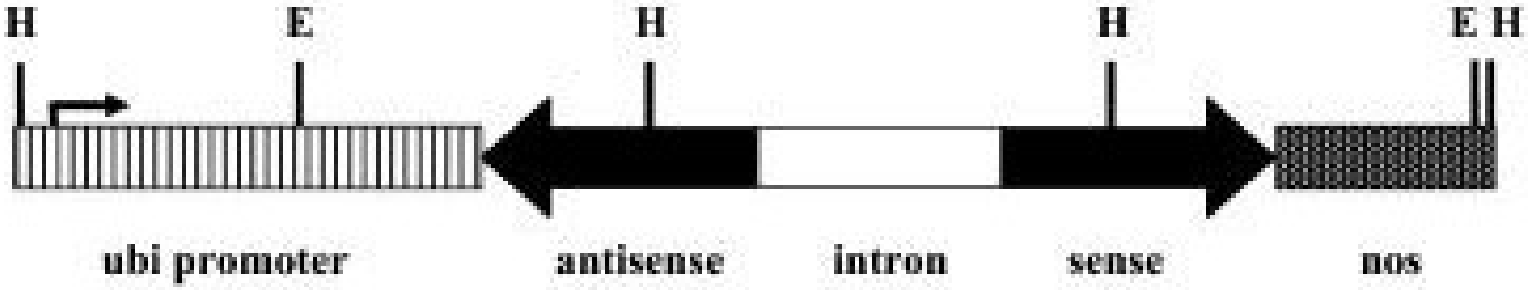
1. **Скорость**
2. **Летальные исходы**
3. **Мультигенные семейства**
4. **????**

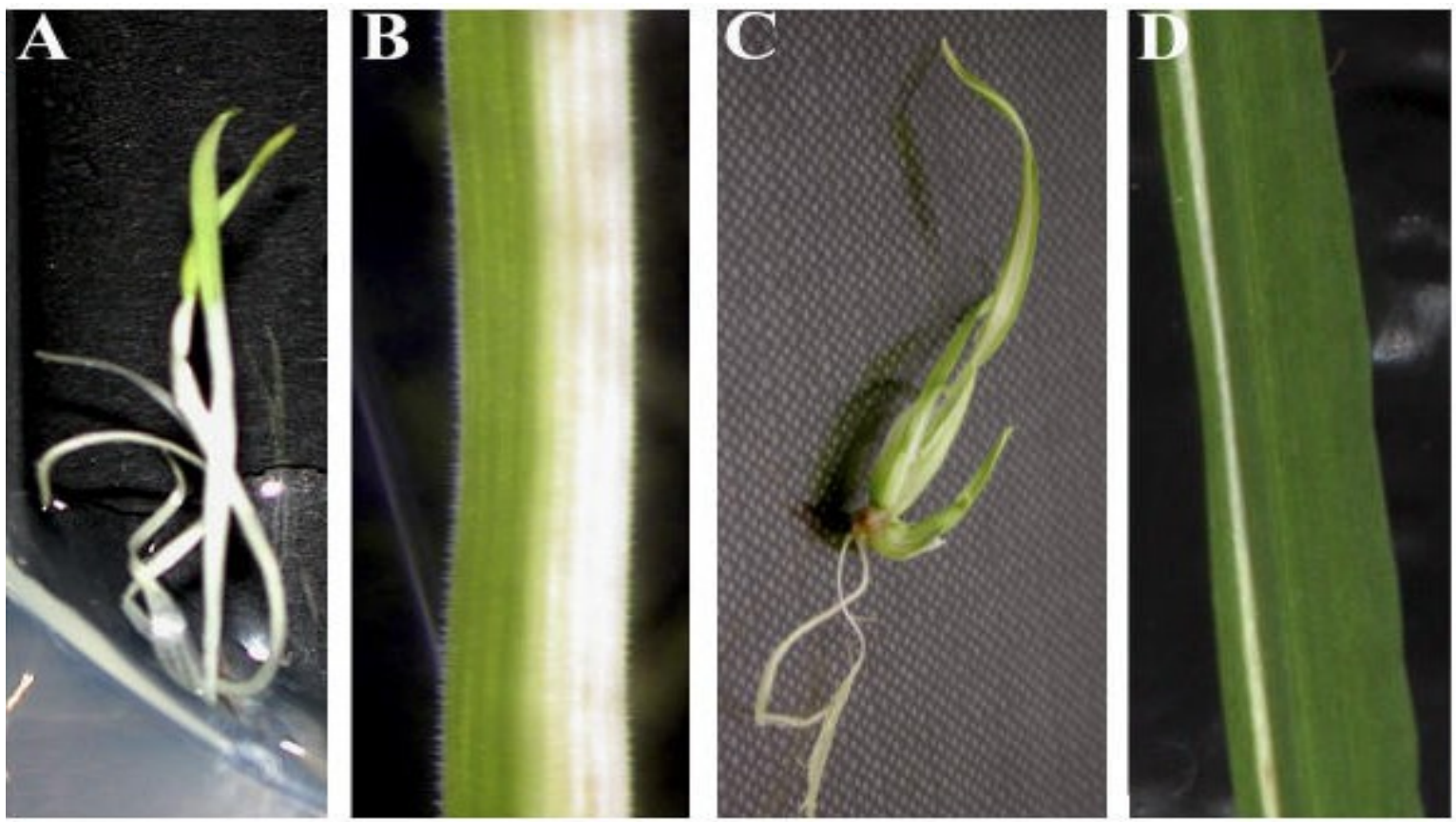
Картирование и аннотация генов у растений

- Образец текста
  - Второй уровень
    - Третий уровень
      - Четвертый уровень
        - Пятый уровень

Преимущества нокдауна перед нокаутом:

1. **Скорость**
2. **Летальные исходы**
3. **Мультигенные семейства**
4. **Полиплоиды**


H
E
H
H
E H
ubi promoter
antisense
intron
sense
nos


A
B
C
D

Картирование и аннотация генов у растений

- Образец текста
  - Второй уровень
    - Третий уровень
      - Четвертый уровень
        - Пятый уровень

Преимущества нокдауна перед нокаутом:

1. **Скорость**
2. **Летальные исходы**
3. **Мультигенные семейства**
4. **Полиплоиды**
5. **Нет необходимости знать точную нуклотидную последовательность гена.**

Медицина

- окончание проекта «Геном человека»;
- многие из новых обнаруженных мишеней, которые удалось идентифицировать посредством экспрессии генов, а также посредством проведения экспериментов по РНК-интерференции в тканях клеточных культур, вероятнее всего, будут недоступны для воздействия низкомолекулярными препаратами (small-molecule drugs) или биологическими препаратам.

Преимущества РНК-интерференции

РНК-интерференция и процесс разработки инновационных препаратов: RNA*i* позволяет «перепрыгнуть» ряд этапов в создании препарата

Способы доставки

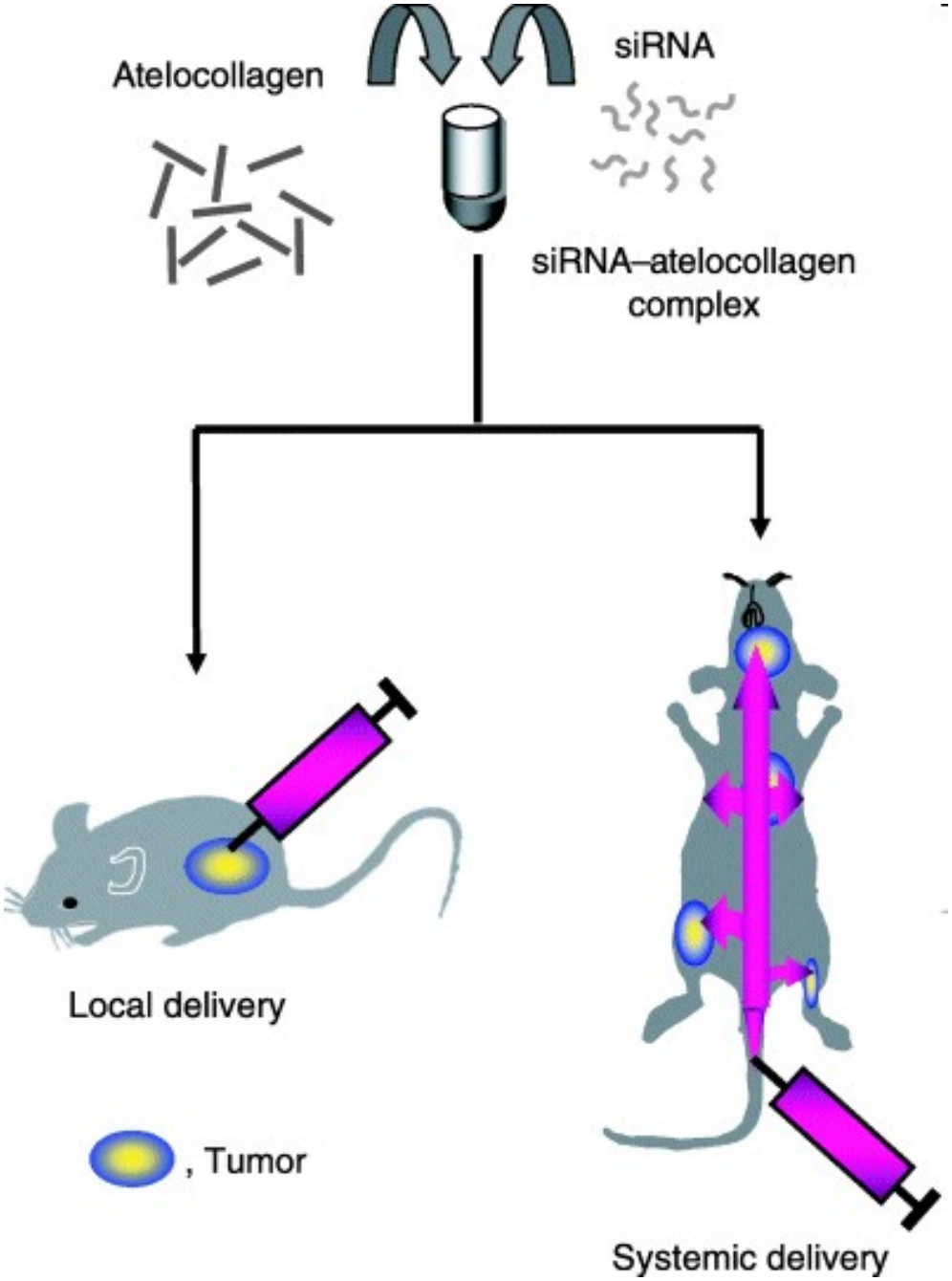
- naked siRNA
- Аденовирусные вектора

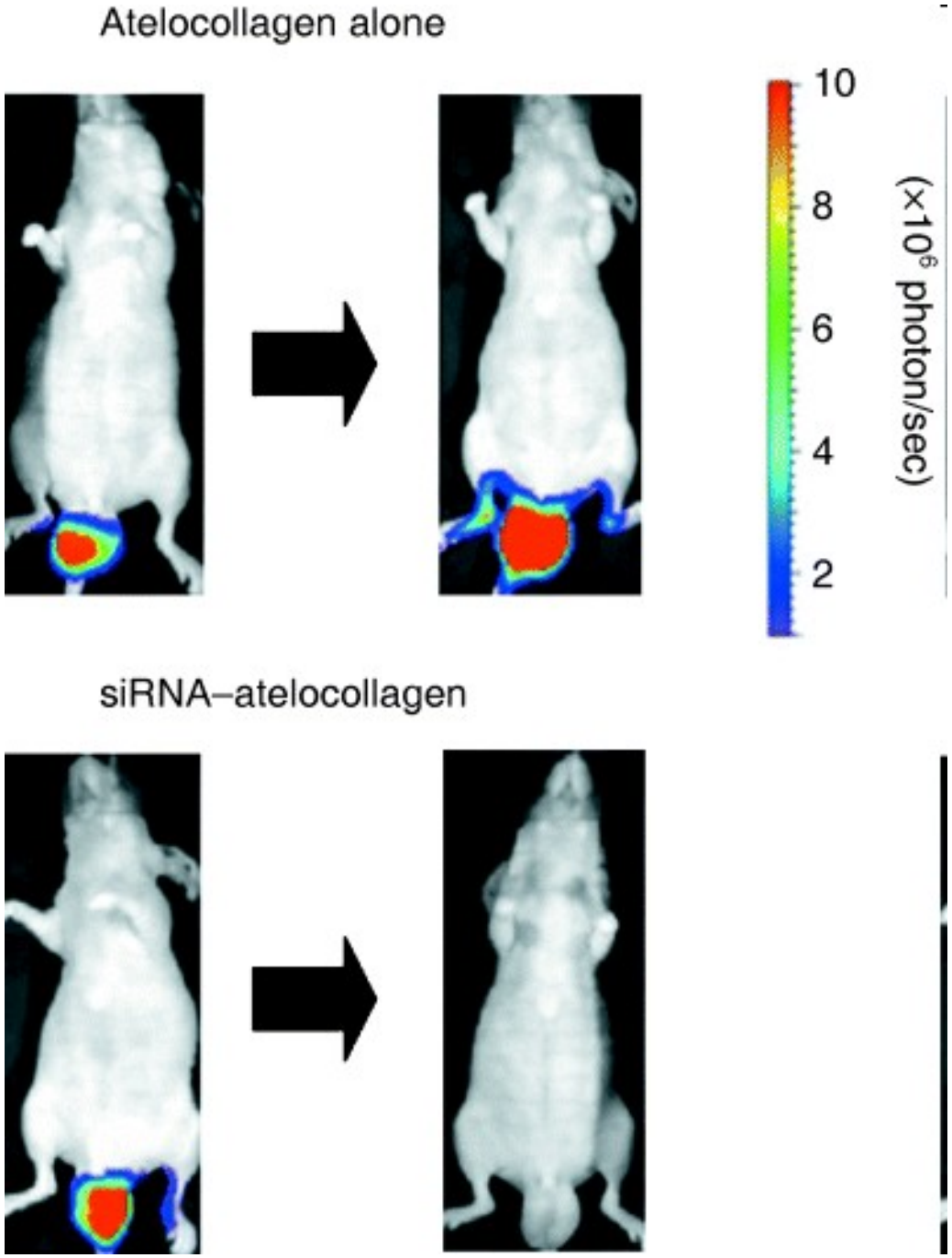
Гидродинамический подход (системное введение)

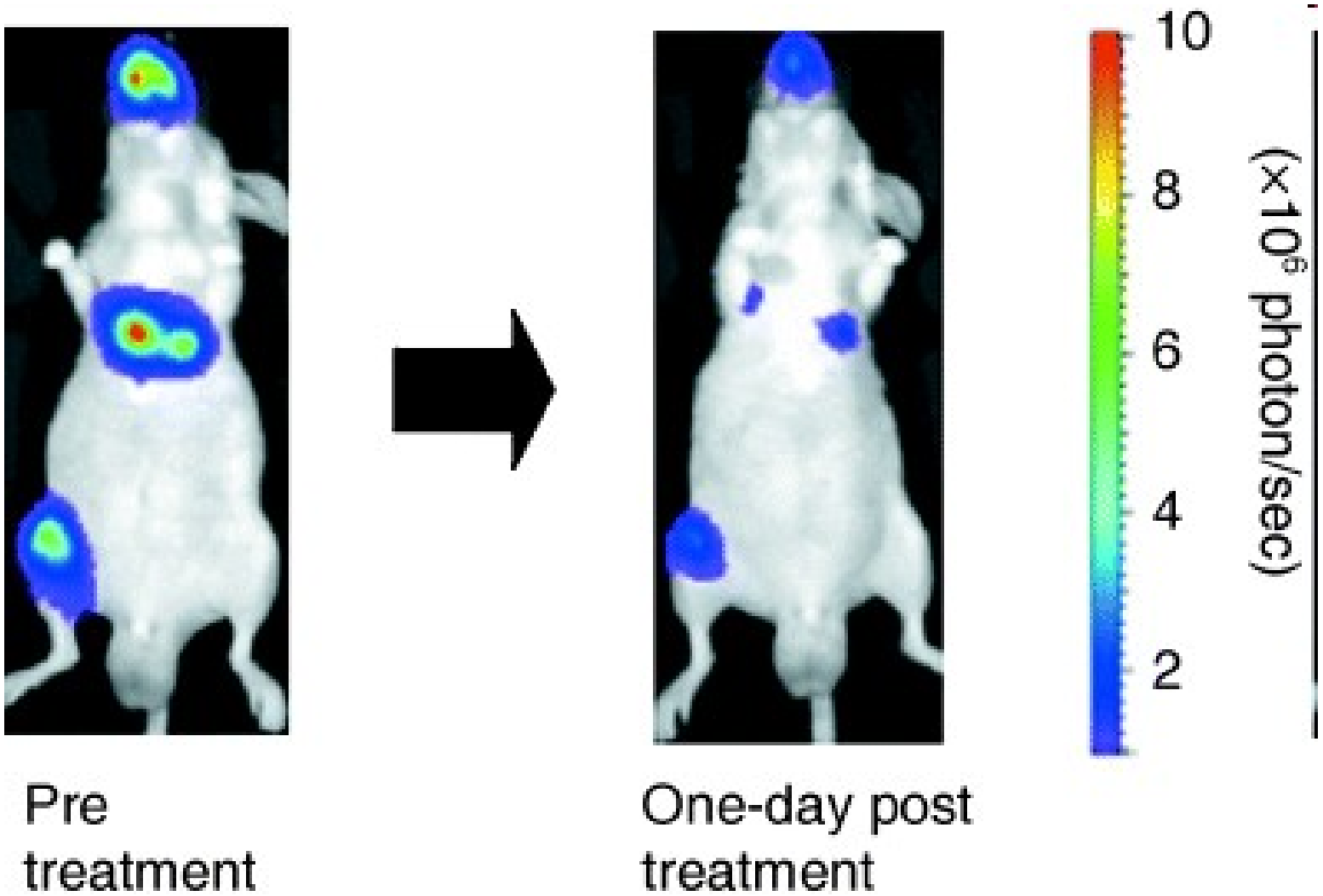
- Липосомы (печень)
- Использование антител (опухоль)

Непосредственно в опухоль (орган)

- Глаз (AMD) –”Sirna-027”
- Легкие (RSV)
- Печень
- Мышцы
- Мочевой пузырь

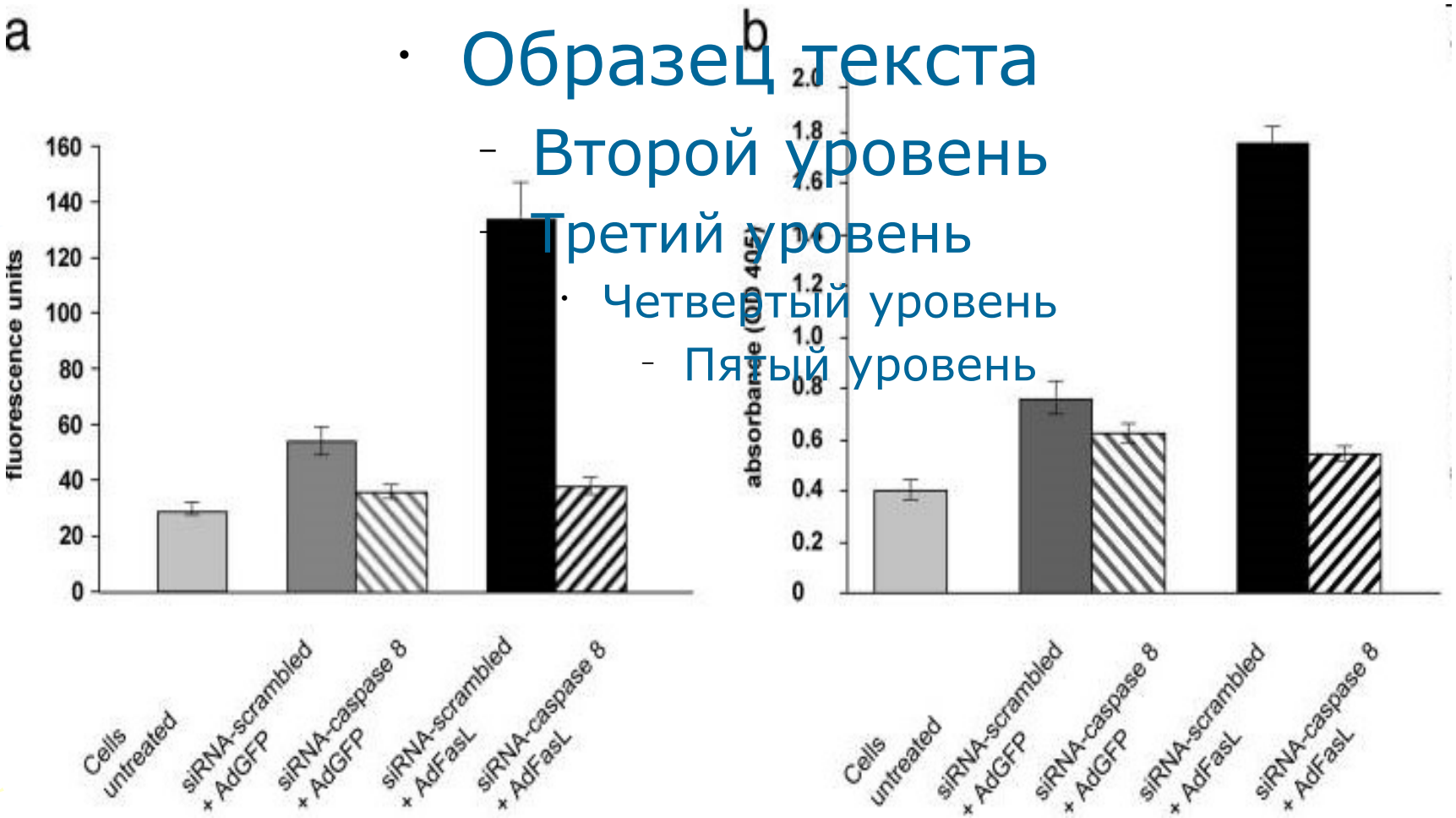

Atelocollagen
siRNA
siRNA–atelocollagen complex
Local delivery
, Tumor
Systemic delivery


Atelocollagen alone
siRNA–atelocollagen
10
8
6
4
2
(×10⁶ photon/sec)

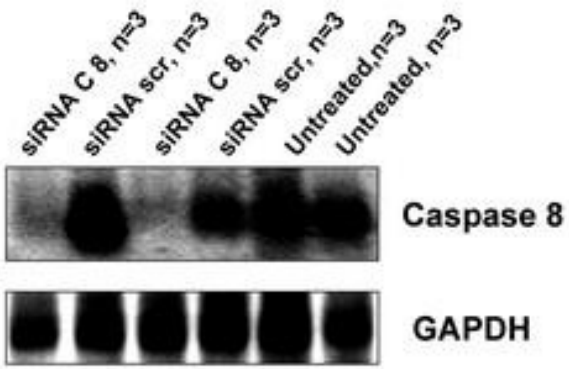

10
8
6
4
2
(×10⁶ photon/sec)
Pre
treatment
One-day post
treatment

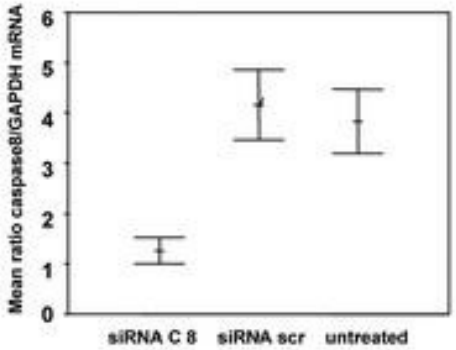
Острая печеночная недостаточность

- Образец текста
  - Второй уровень
    - Третий уровень
      - Четвертый уровень
        - Пятый уровень

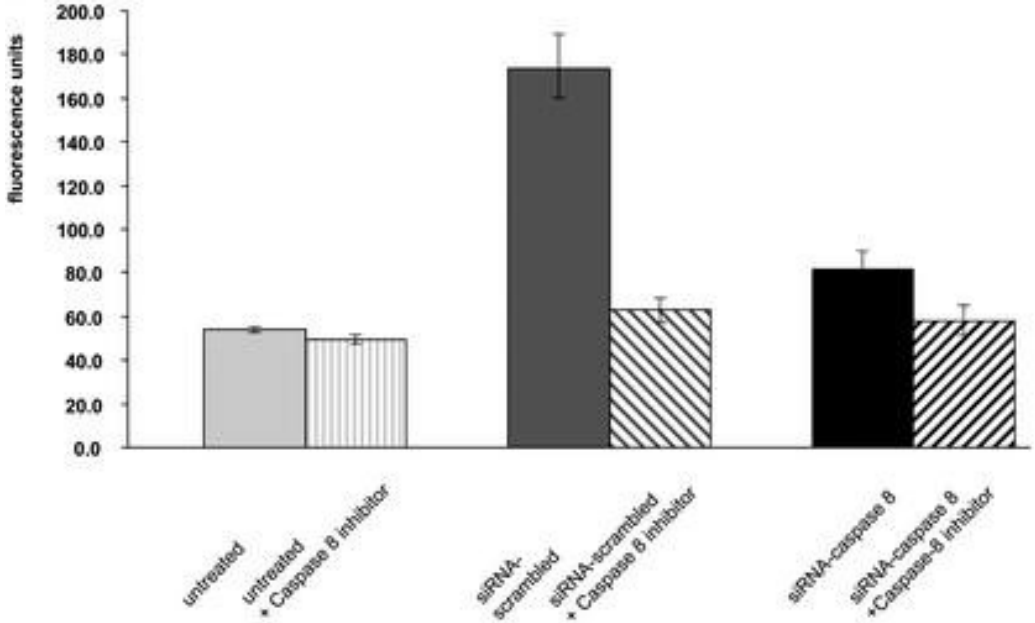


a

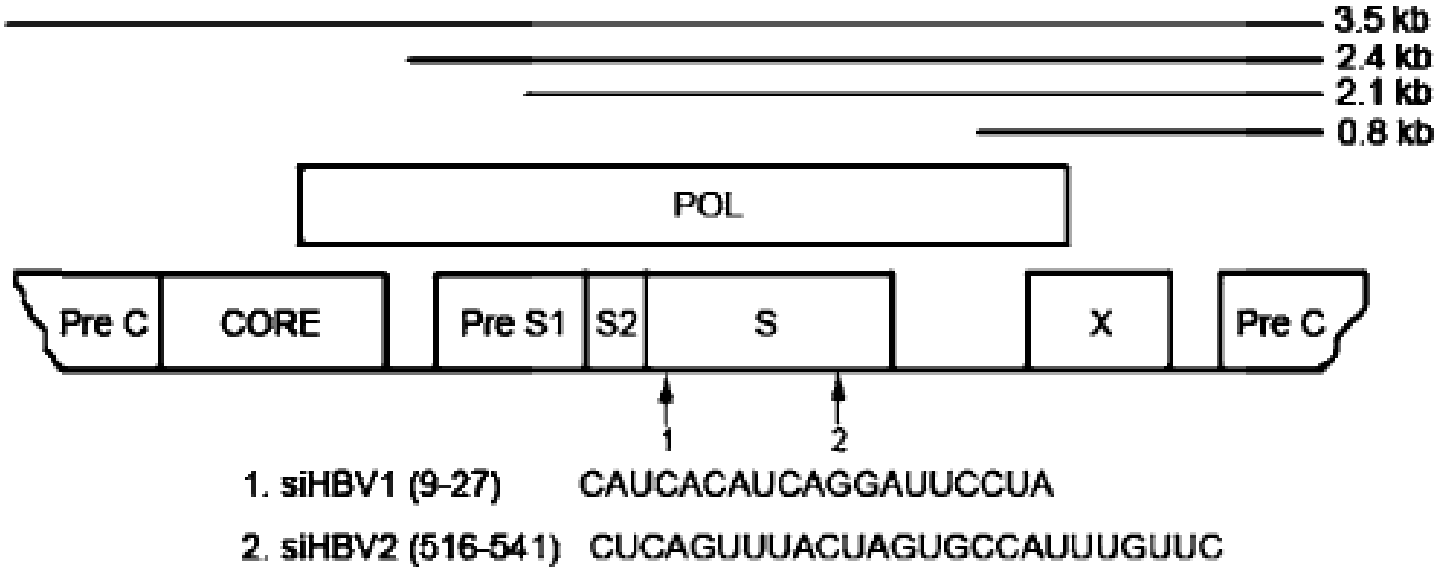

siRNA C 8, n=3
siRNA scr, n=3
siRNA C 8, n=3
siRNA scr, n=3
Untreated,n=3
Untreated, n=3
Caspase 8
GAPDH

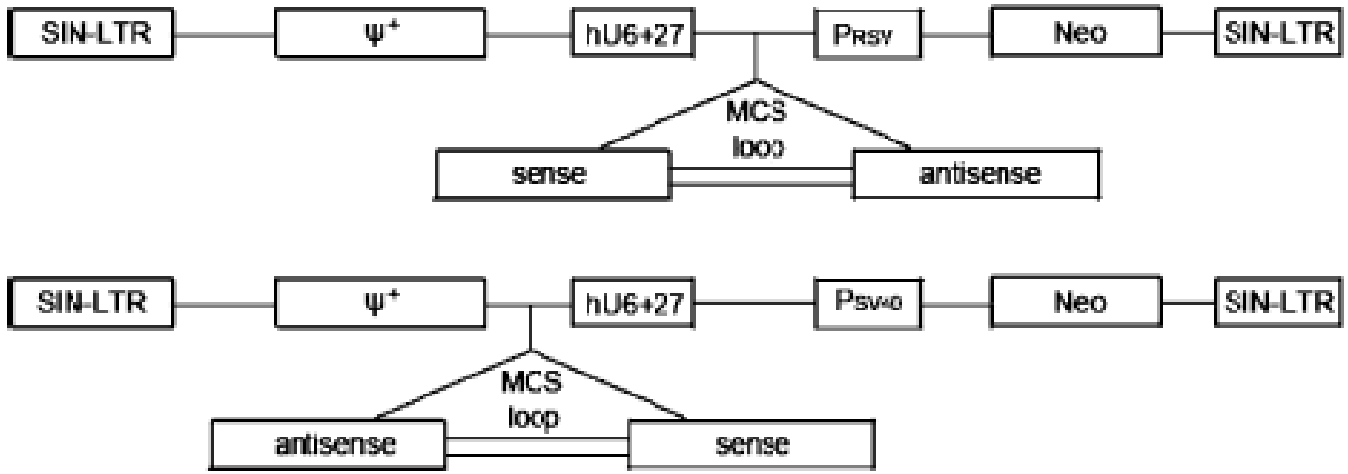

Mean ratio caspase8/GAPDH mRNA
0
1
2
3
4
5
6
siRNA C 8
siRNA scr
untreated

b


fluorescence units
200.0
180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
untreated
untreated + Caspase 8 inhibitor
siRNA-scrambled
siRNA-scrambled + Caspase 8 inhibitor
siRNA-caspase 8
siRNA-caspase 8 +Caspase-8 inhibitor

Гепатит В


3.5 kb
2.4 kb
2.1 kb
0.8 kb
POL
Pre C
CORE
Pre S1
S2
S
X
Pre C
1
2
1. siHBV1 (9-27) CAUCACAUCAGGAUUCCUA
2. siHBV2 (516-541) CUCAGUUUACUAGUGCCAUUUGUUC


SIN-LTR
ψ+
hU6+27
PRSV
Neo
SIN-LTR
MCS
loop
sense
antisense
SIN-LTR
ψ+
hU6+27
PSV40
Neo
SIN-LTR
MCS
loop
antisense
sense

(b)

Sal I
Terminal signal
5'-TCGACATCACATCAGGATTCCTATTCAAGAGATAGGAATCCTGATGTGATGAAAAA-3'
3'-GTAGTGTAGTCCTAAGGATAAGTTCTCTATCCTTAGGACTACACTACTTTTTGATC-5'
Sense
Loop
Antisense
XbaI
Sal I
Terminal signal
5'-TCGACTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCTTCAAGAGTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGAGAAAAA-3'
3'-GAGTCAAATGATCACGGTAAACAAGAAGTTCTCACTTGTTTACCGTGATCATTTGACTCTTTTTGATC-5
Sense
Loop
Antisense
XbaI

(c)

5'-CAUCACAUCAGGAUUCCUA
3'-UgGUAGUGUAGUCCUAAGGAU

(d)

5'-CUCAGUUUACUAGUGCCAUUUGUUC
3'-UgGAGUCAAAUGAUCACGGUAAACAAGA

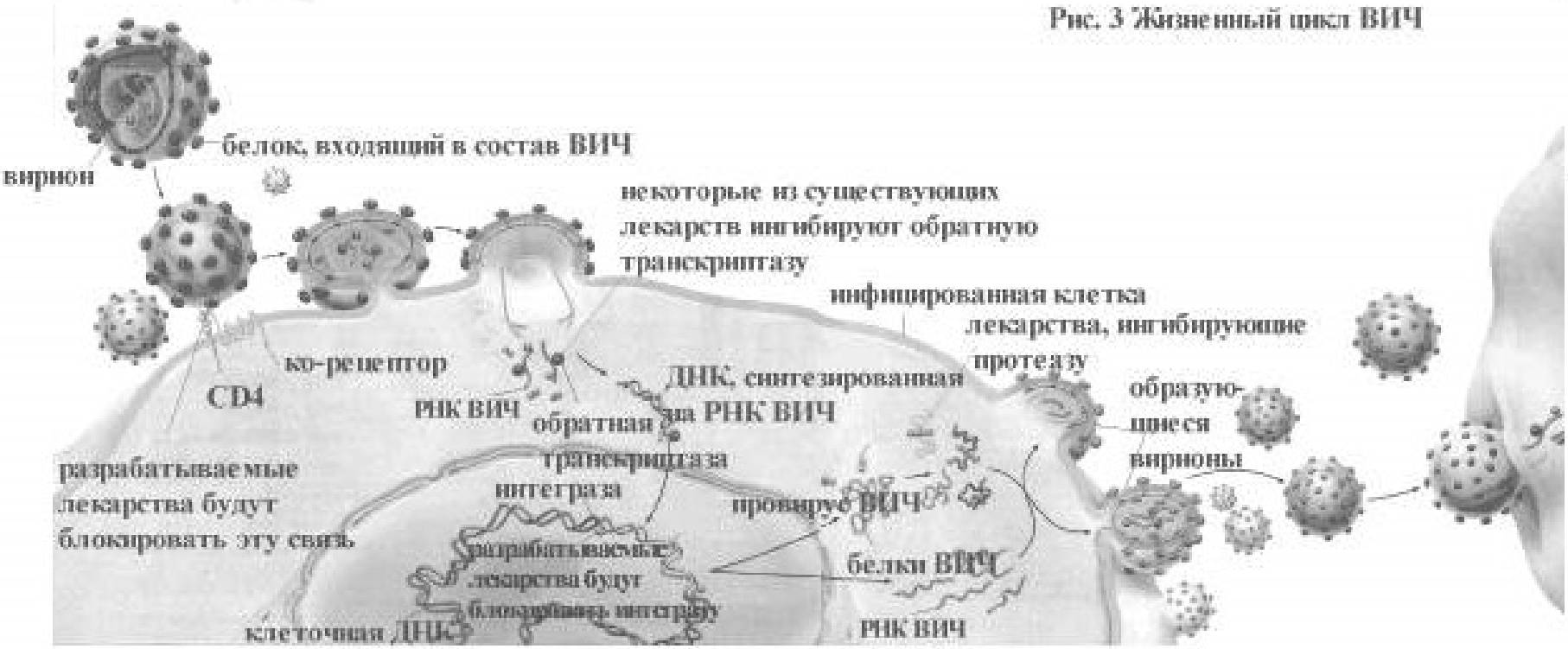
HIV

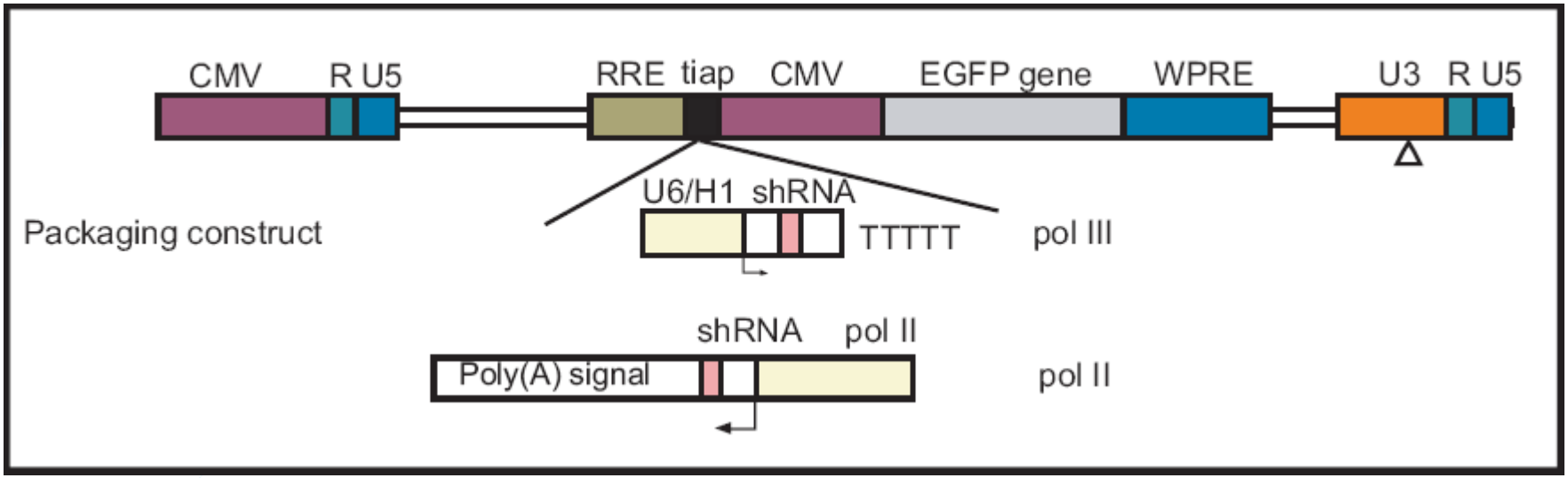
- Образец текста
  - Второй уровень
    - Третий уровень
      - Четвертый уровень
        - Пятый уровень

HIV

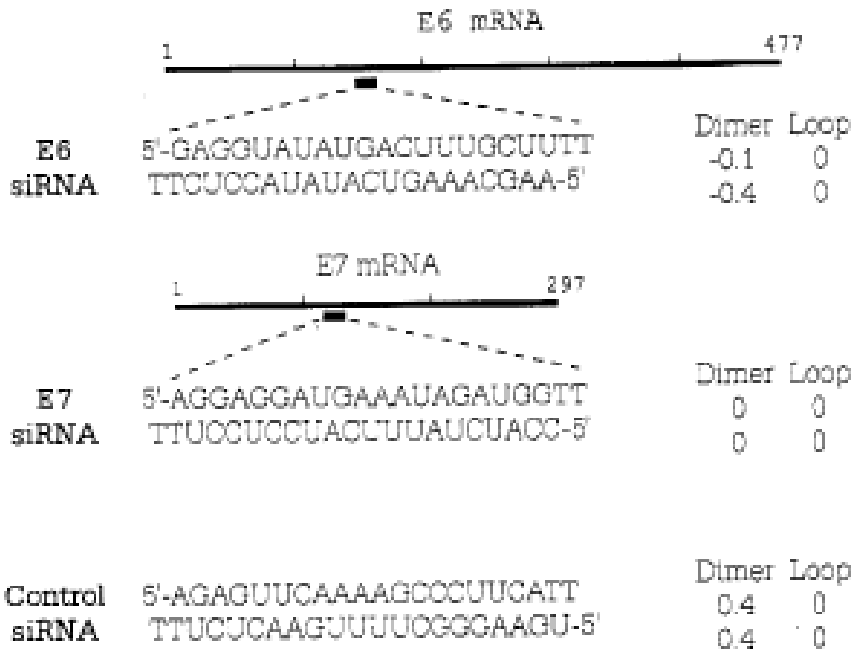
- Образец текста
  - Второй уровень
    - Третий уровень
      - Четвертый уровень
        - Пятый уровень

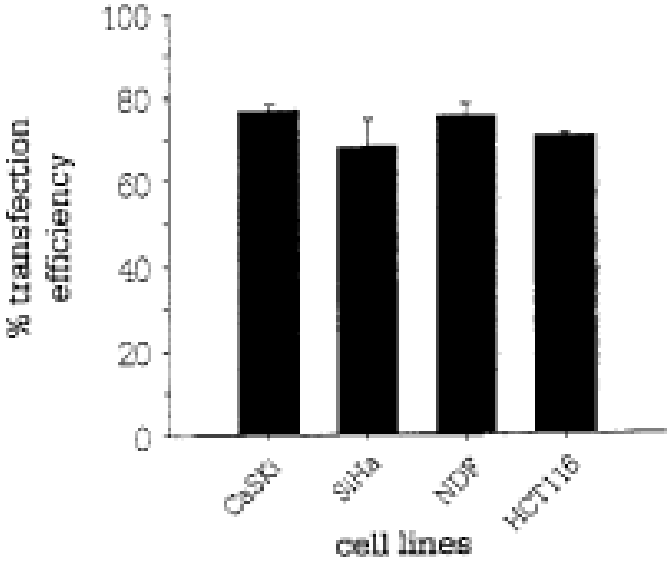
Рис. 3 Жизненный цикл ВИЧ

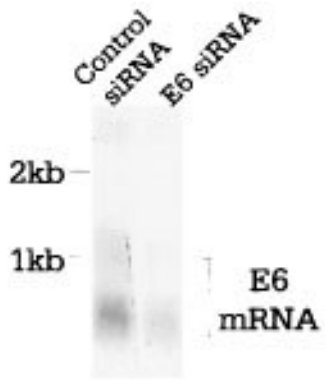


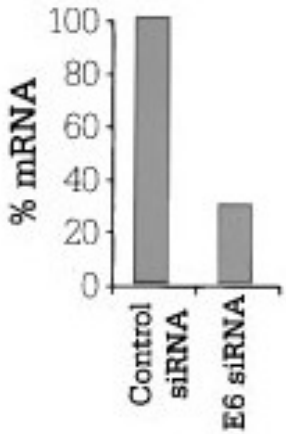

CMV
R U5
RRE
tiap
CMV
EGFP gene
WPRE
U3
R U5
Packaging construct
U6/H1
shRNA
TTTTT
pol III
shRNA
pol II
Poly(A) signal
pol II

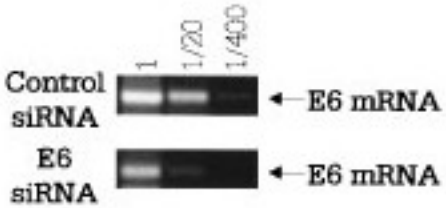
HPV

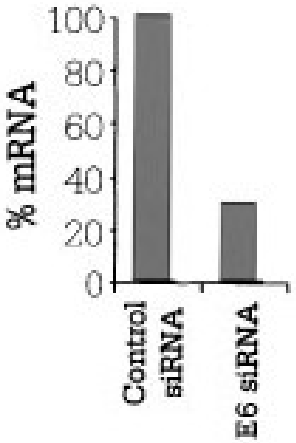

E6 mRNA
1
477
E6 siRNA
5'-GAGGUAUAUGACUUUGCUUTT
TTCUCCAUAUACUGAAACGAA-5'
Dimer Loop
-0.1 0
-0.4 0
E7 mRNA
1
297
E7 siRNA
5'-AGGAGGAUGAAAUAGAUGGTT
TTUCCUCCUACUUUAUCUACC-5'
Dimer Loop
0 0
0 0
Control siRNA
5'-AGAGUUCAAAAGCCCUUCATT
TTUCUCAAGUUUUCGGGAAGU-5'
Dimer Loop
0.4 0
0.4 0

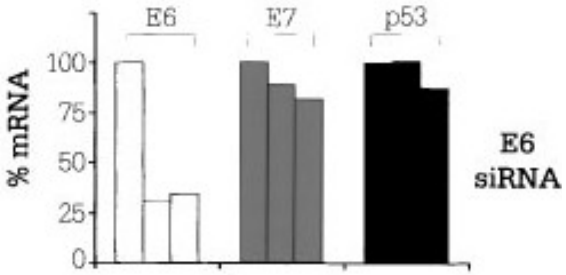

% transfection efficiency
100
80
60
40
20
0
CaSki
SiHa
NDF
HCT116
cell lines

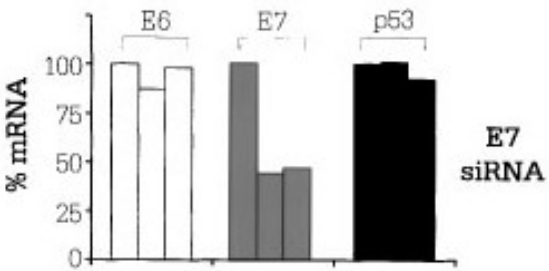

Control siRNA
E6 siRNA
2kb
1kb
E6 mRNA

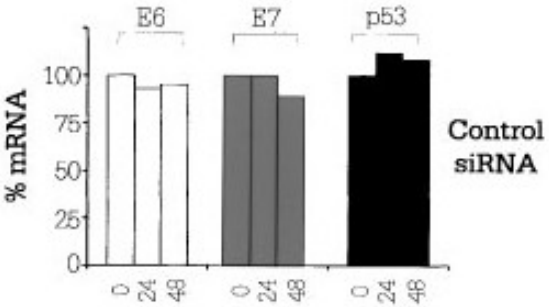

% mRNA
100
80
60
40
20
0
Control siRNA
E6 siRNA

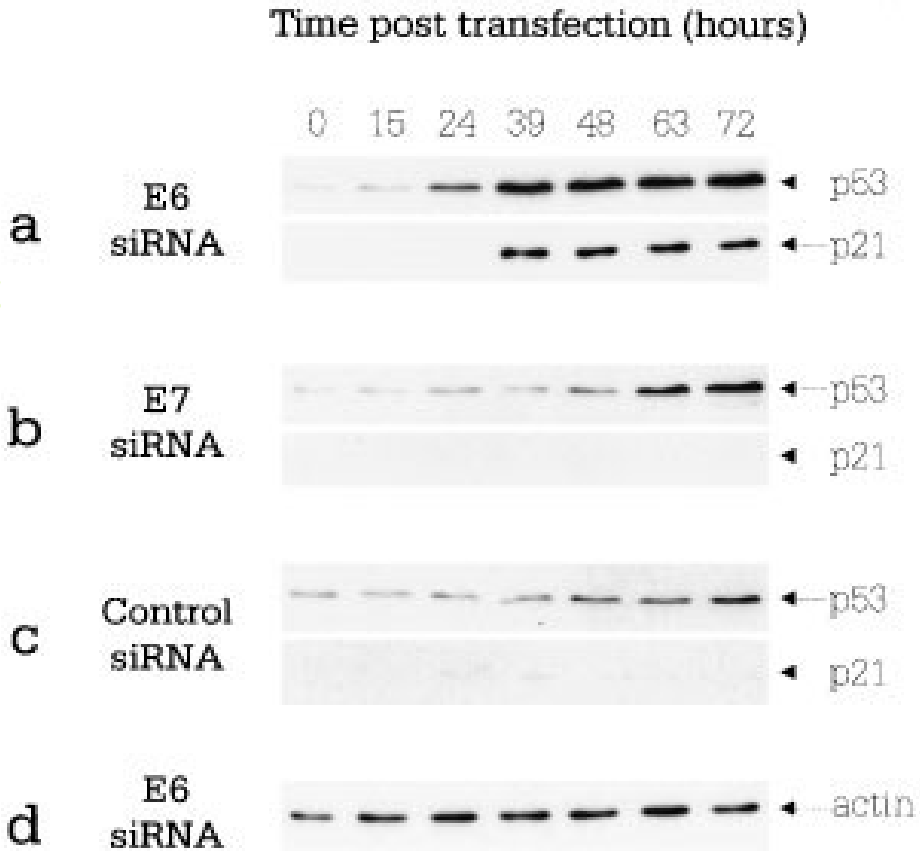

1
1/20
1/400
Control siRNA
E6 siRNA
E6 mRNA
E6 mRNA

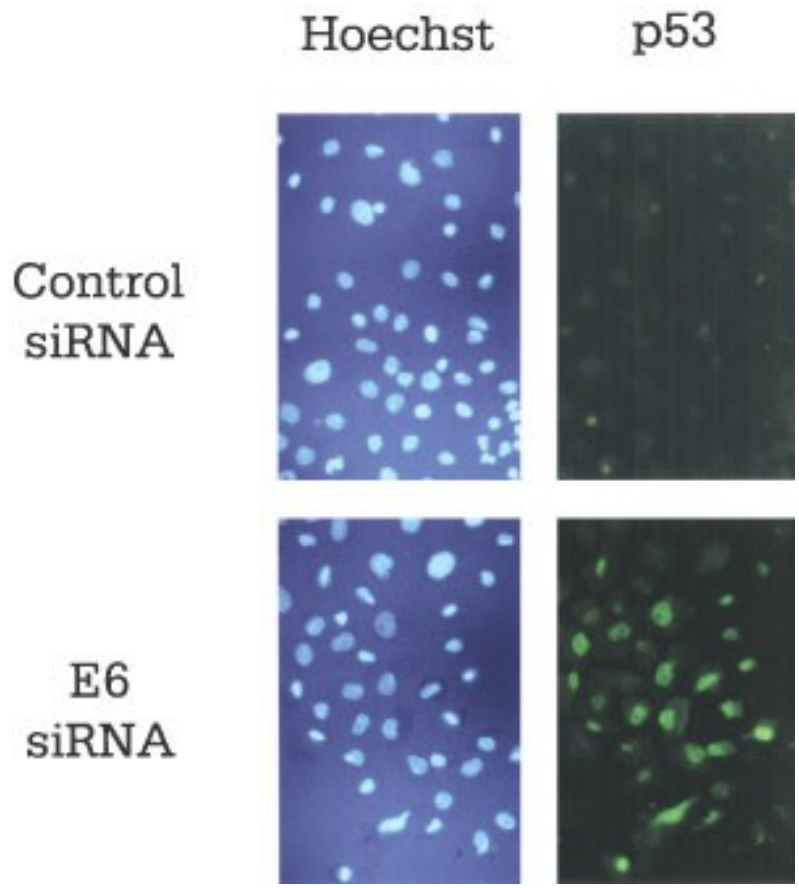

% mRNA
100
80
60
40
20
0
Control siRNA
E6 siRNA

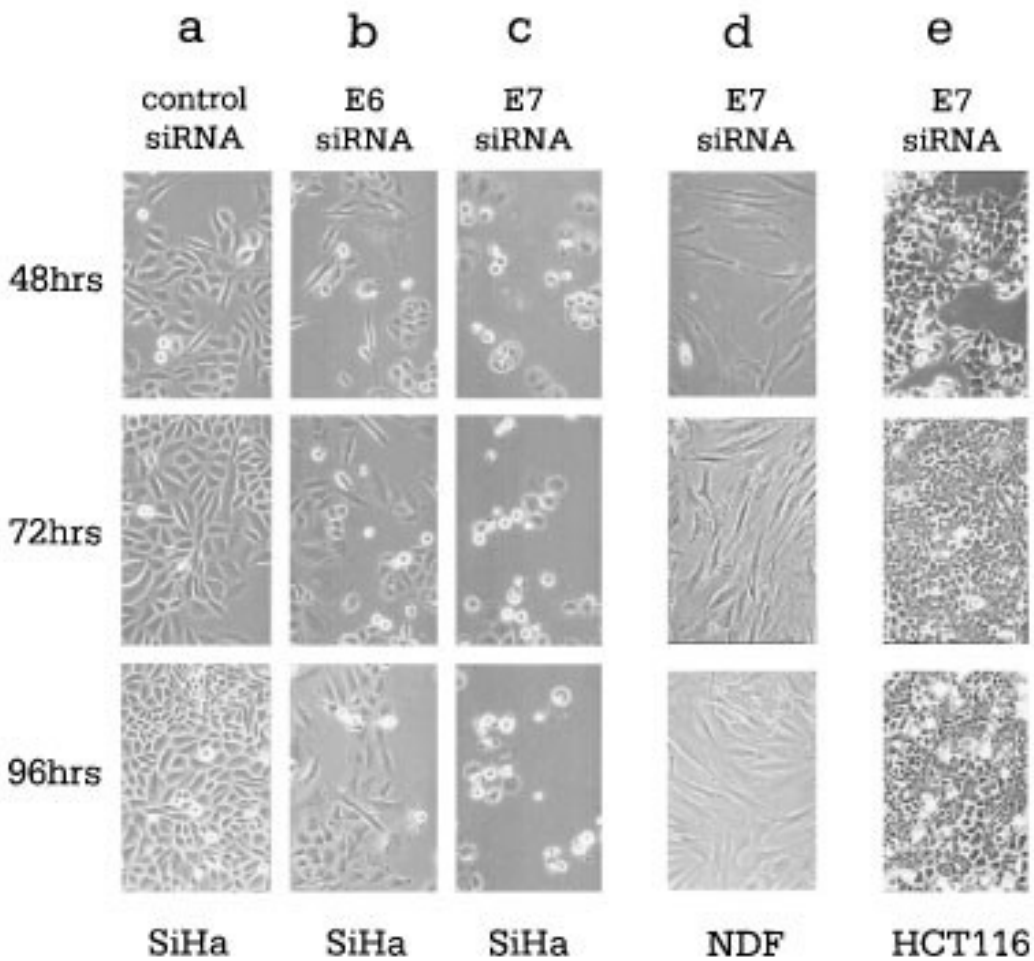

E6
E7
p53
% mRNA
100
75
50
25
0
E6 siRNA

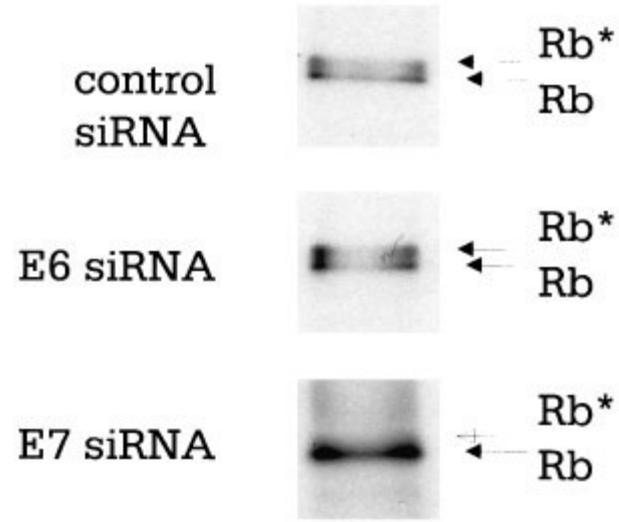

E6
E7
p53
% mRNA
100
75
50
25
0
E7 siRNA

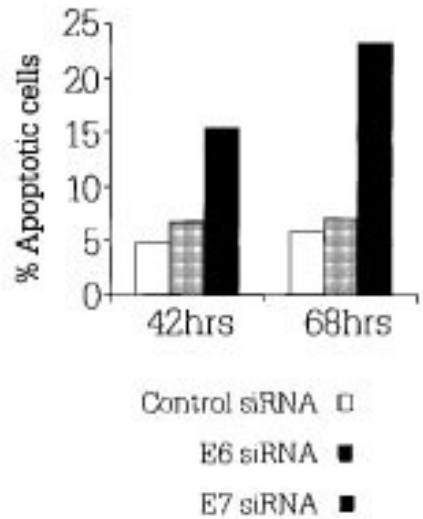

E6
E7
p53
% mRNA
100
75
50
25
0
0
24
48
0
24
48
0
24
48
Control siRNA


Time post transfection (hours)
0 15 24 39 48 63 72
a
E6 siRNA
p53
p21
b
E7 siRNA
p53
p21
c
Control siRNA
p53
p21
d
E6 siRNA
actin


Hoechst
p53
Control siRNA
E6 siRNA


a
b
c
d
e
control siRNA
E6 siRNA
E7 siRNA
E7 siRNA
E7 siRNA
48hrs
72hrs
96hrs
SiHa
SiHa
SiHa
NDF
HCT116


control siRNA
E6 siRNA
E7 siRNA
Rb*
Rb
Rb*
Rb
Rb*
Rb


% Apoptotic cells
25
20
15
10
5
0
42hrs
68hrs
Control siRNA
E6 siRNA
E7 siRNA

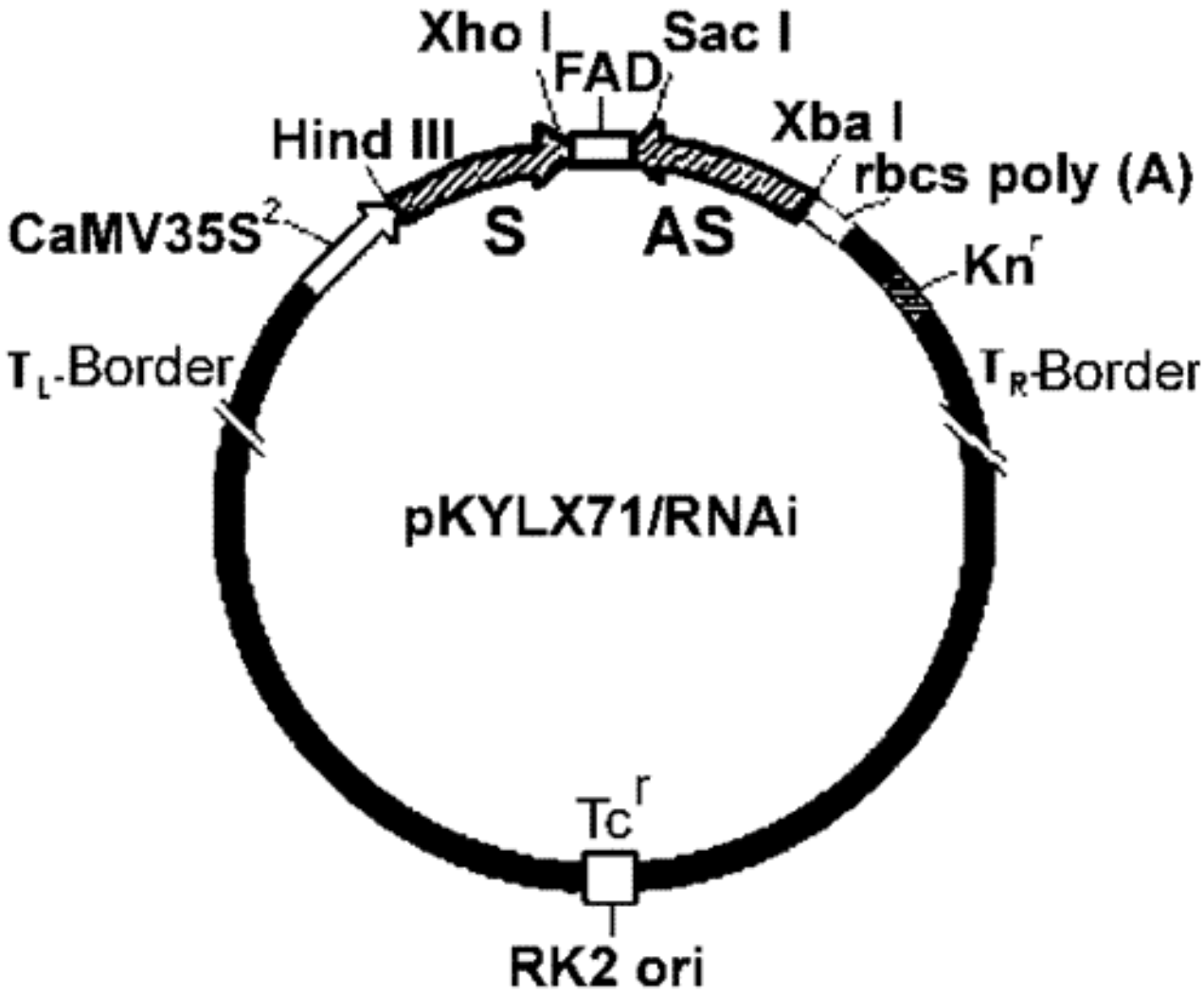
Tumor

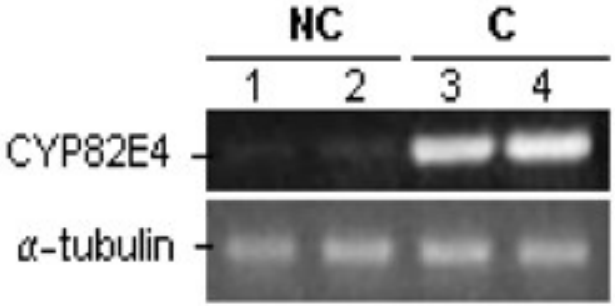
- Выбор мишени
- Дизайн киРНК
- Оценка эффективности
- Функциональный анализ для оценки механизма антиопухолевого эффекта
- Система доставки

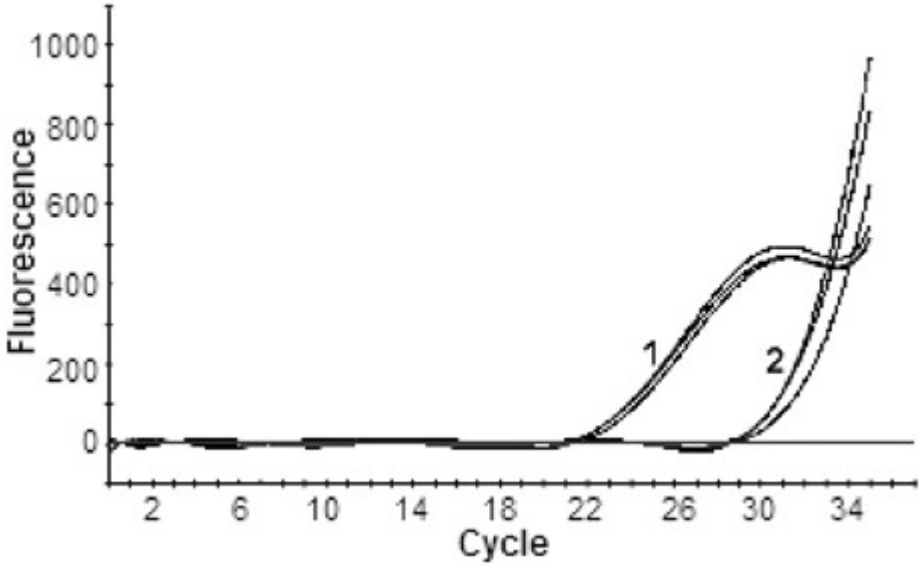
Биотехнология

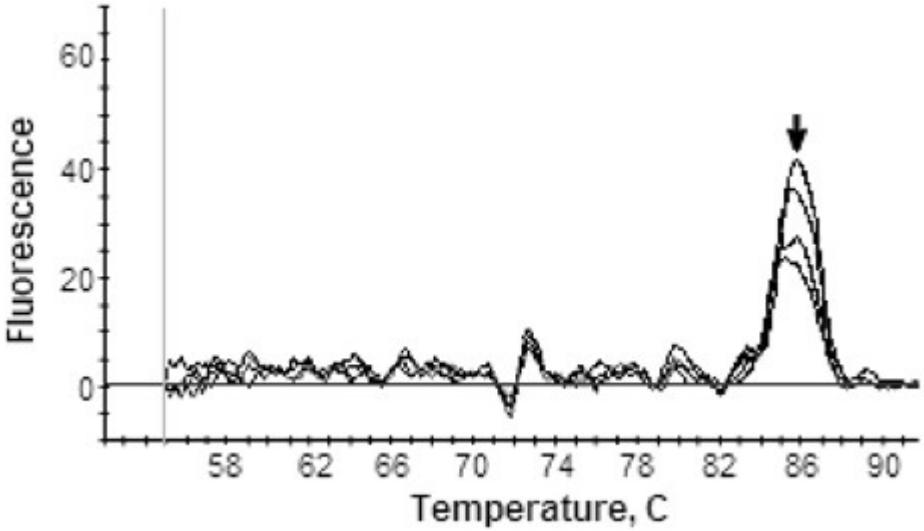
- Производство интерферона клетками СНО
- Интерференция в растениях

Табак с пониженным содержанием норникотина

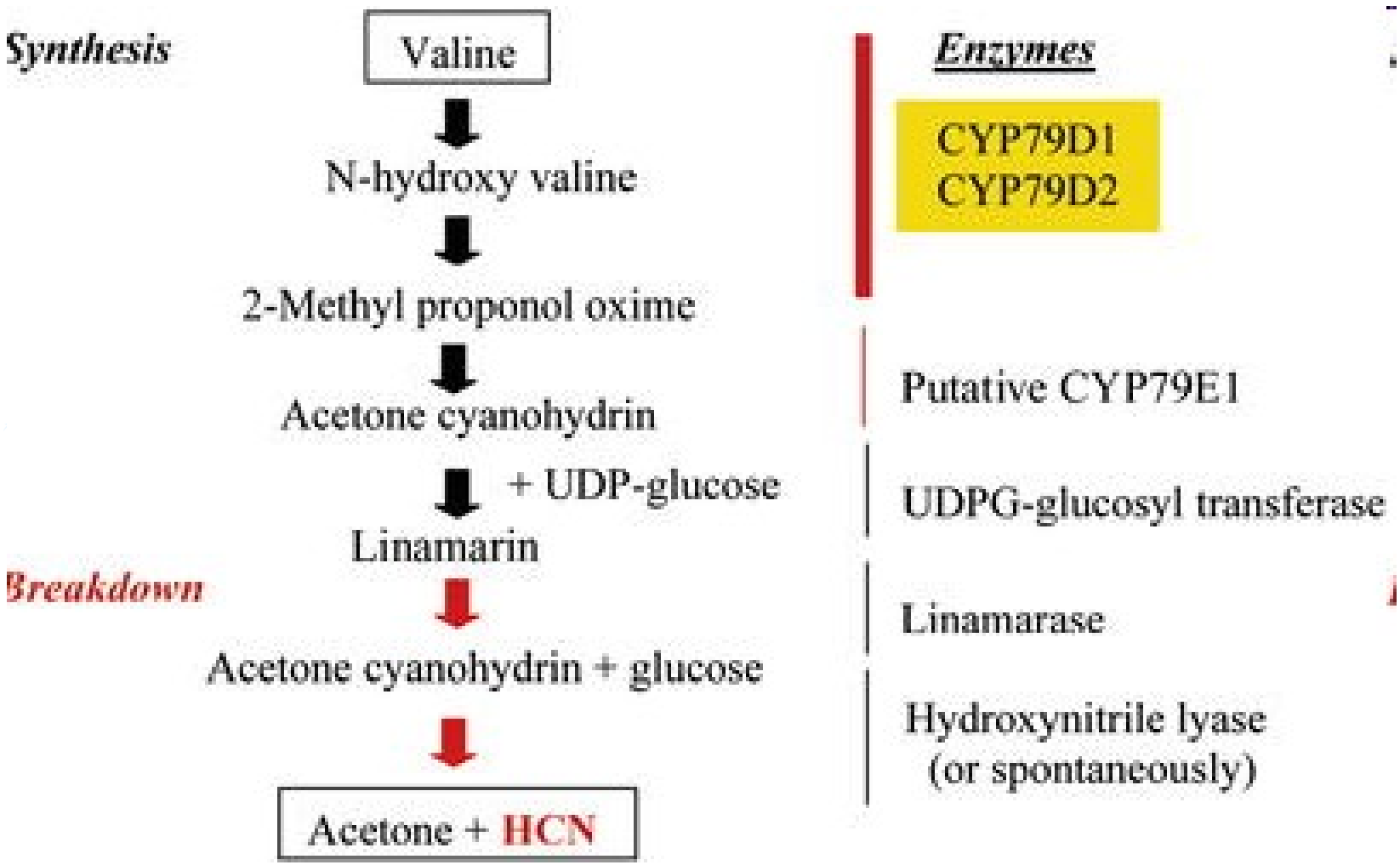


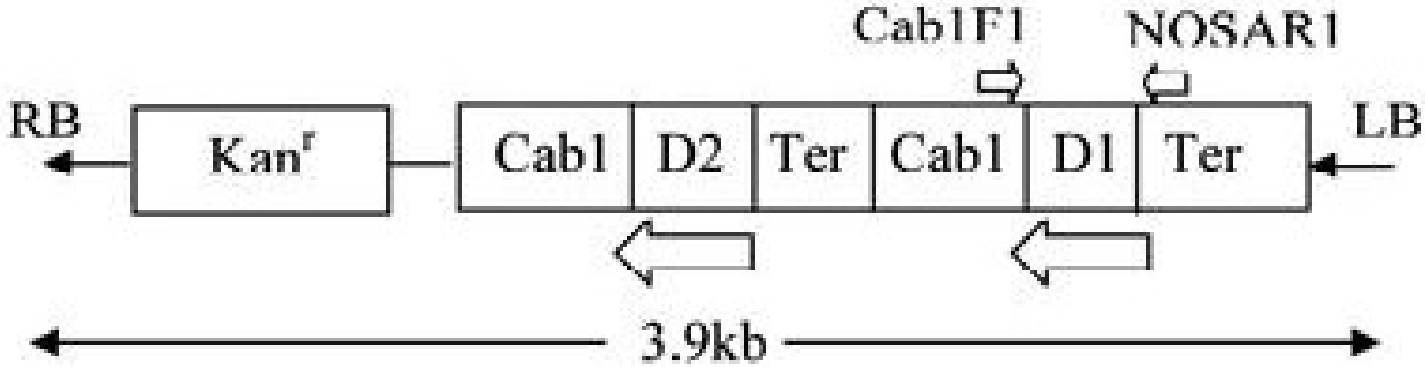

NC
C
1
2
3
4
CYP82E4
α-tubulin

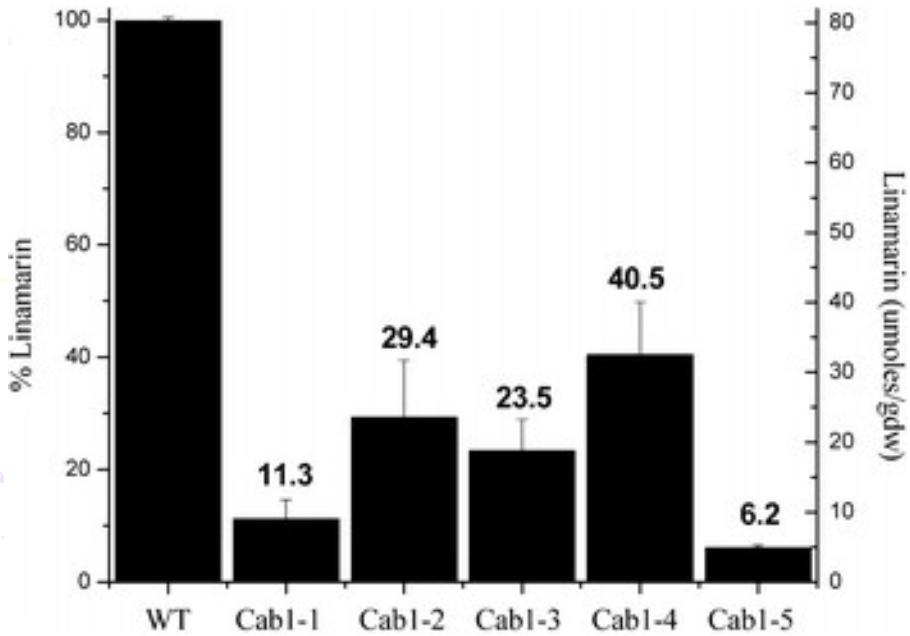

Fluorescence
1000
800
600
400
200
0
1
2
2
6
10
14
18
22
26
30
34
Cycle

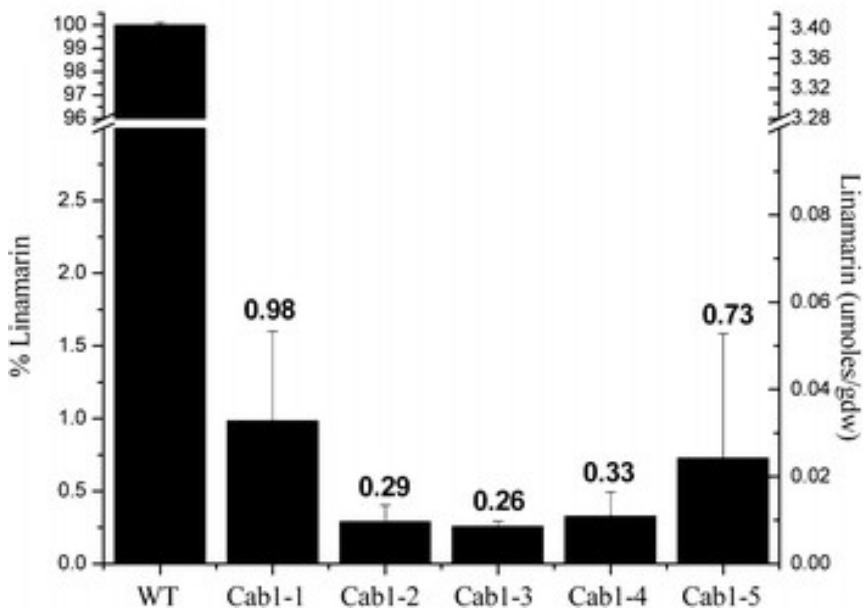

Fluorescence
60
40
20
0
58
62
66
70
74
78
82
86
90
Temperature, C

Маниока

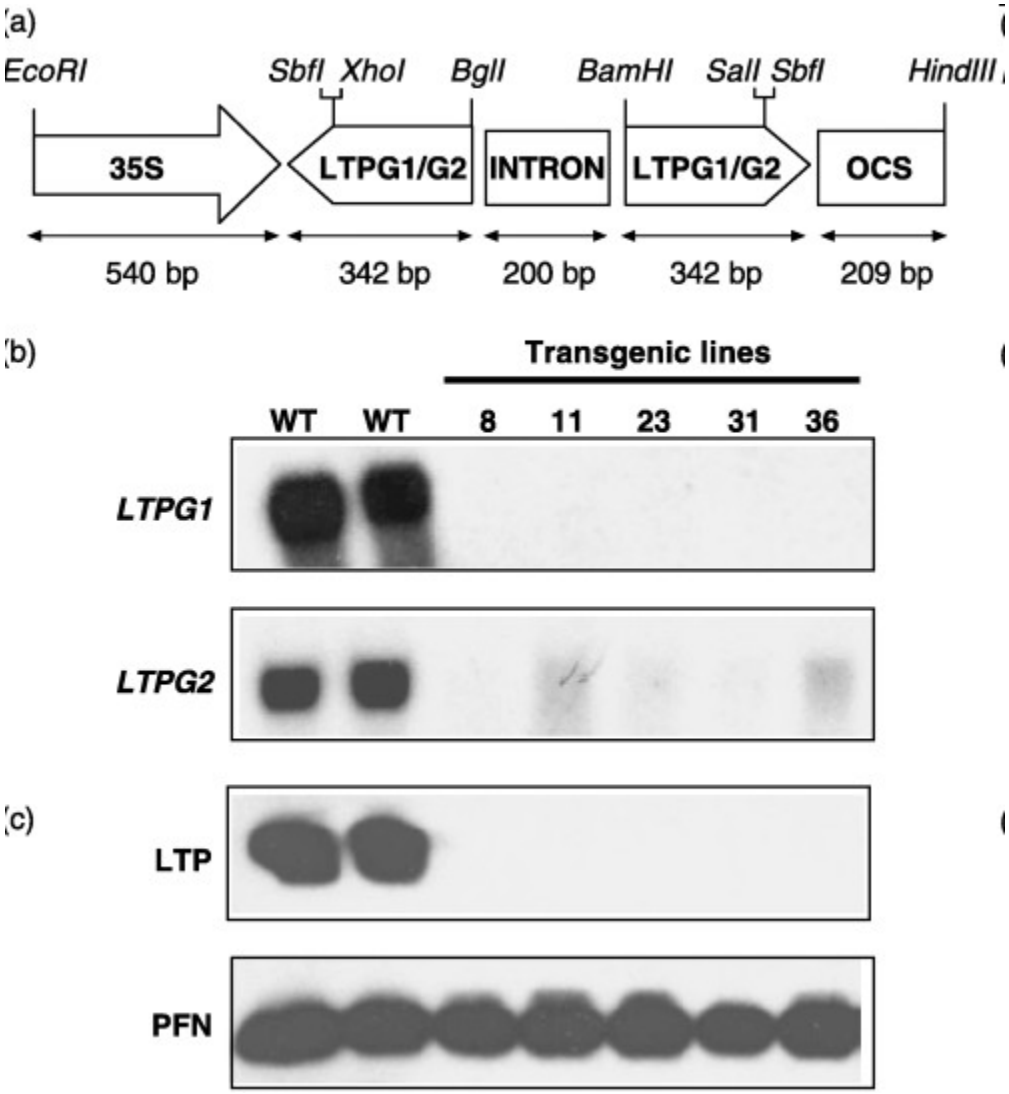

Synthesis
Valine
N-hydroxy valine
2-Methyl proponol oxime
Acetone cyanohydrin
+ UDP-glucose
Linamarin
Breakdown
Acetone cyanohydrin + glucose
Acetone + HCN
Enzymes
CYP79D1
CYP79D2
Putative CYP79E1
UDPG-glucosyl transferase
Linamarase
Hydroxynitrile lyase
(or spontaneously)


Cab1F1
NOSAR1
RB
Kan^r
Cab1
D2
Ter
Cab1
D1
Ter
LB
3.9kb


% Linamarin
Linamarin (umoles/gdw)
11.3
29.4
23.5
40.5
6.2
WT
Cab1-1
Cab1-2
Cab1-3
Cab1-4
Cab1-5


% Linamarin
Linamarin (umoles/gdw)
0.98
0.29
0.26
0.33
0.73
WT
Cab1-1
Cab1-2
Cab1-3
Cab1-4
Cab1-5

Томаты


(a)
EcoRI
SbfI
XhoI
BglI
BamHI
SalI
SbfI
HindIII
35S
LTPG1/G2
INTRON
LTPG1/G2
OCS
540 bp
342 bp
200 bp
342 bp
209 bp
(b)
Transgenic lines
WT
WT
8
11
23
31
36
LTPG1
LTPG2
(c)
LTP
PFN