

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот

На правах рукописи

Чиглинцева Дарья Александровна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы как эффективные ингибиторы
онкогенных микроРНК

Направление подготовки	1.5. Биологические науки
Специальность	1.5.4 – Биохимия

Аспирант	Чиглинцева Дарья Александровна
Научный руководитель	к.б.н. Патутина Ольга Александровна
Рецензент	д.х.н. Грайфер Дмитрий Маратович

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель:

Патутина Ольга Александровна

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	6
1.1. Актуальность темы исследования и степень её разработанности	6
1.2. Научная новизна полученных результатов	8
1.3. Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
1.4. Апробация работы и публикации	9
1.5. Личный вклад автора.....	10
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	11
2.1. Материалы	11
2.1.1. Реактивы и препараты.....	11
2.1.2. Оборудование.....	11
2.1.3. Олигонуклеотиды и миРНКазы	12
2.1.4. Буферы и растворы.....	15
2.1.5. Трансфицирующие агенты	15
2.1.6. Клеточные культуры	15
2.1.7. Лабораторные животные	16
2.2. Методы	16
2.2.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в нативных условиях.....	16
2.2.2. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях	16
2.2.3. Введение радиоизотопной метки в состав микроРНК с использованием полинуклеотидкиназы	16
2.2.4. Гибридизация олигонуклеотидов и миРНКаз с микроРНК	17
2.2.5. Расщепление микроРНК с помощью миРНКаз или олигонуклеотидов	17
2.2.6. рН-зависимое расщепление микроРНК под действием двойных миРНКаз	17
2.2.7. Расщепление микроРНК под действием миРНКаз в присутствии фермента РНКазы H1	18
2.2.8. Частичный гидролиз микроРНК в денатурирующих условиях	18
2.2.9. Анализ эффективности гибридизации и расщепления микроРНК.....	18
2.2.10. Нуклеазоустойчивость миРНКаз и олигонуклеотидов в ростовой среде	19
2.2.11. Приготовление комплексов катионных липосом и нуклеиновых кислот	19
2.2.12. Трансфекция клеток олигонуклеотидами и миРНКазами.....	20
2.2.13. Выделение суммарной клеточной РНК из опухолевых клеток	20
2.2.14. Определение уровня экспрессии микроРНК в опухолевых клетках методом количественной ОТ-ПЦР	21
2.2.14.1. Обратная транскрипция.....	21

2.2.14.2. ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических шпилечных праймеров	21
2.2.15. Исследование влияния миРНКаз и олигонуклеотидов на пролиферацию клеток методом WST	21
2.2.16. Исследование влияния миРНКаз на пролиферацию клеток методом МТТ-теста	22
2.2.17. Исследование влияния миРНКаз на пролиферацию клеток в режиме реального времени с помощью системы xCelligence	22
2.2.18. Определение уровня белков-мишеней микроРНК в опухолевых клетках и опухолевой ткани методом Вестерн блот гибридизации	23
2.2.19. Исследование миграционной активности опухолевых клеток методом Scratch теста..	23
2.2.20. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз ex vivo.....	24
2.2.21. Исследование биораспределения вилокподобного олигонуклеотида in vivo	24
2.2.22. Конфокальная микроскопия криосрезов опухоли.....	24
2.2.23. Противоопухолевая активность вилокподобных миРНКаз in vivo	25
2.2.24. Гистологический анализ опухолевых тканей	25
2.2.25. Статистический анализ данных	26
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	27
3.1. Дизайн микроРНК-направленных искусственных рибонуклеаз	27
3.1.1. Дизайн двойных миРНКаз	29
3.1.2. Дизайн петлеобразующих миРНКаз	30
3.1.3. Дизайн крабоподобных миРНКаз	33
3.1.4. Дизайн вилокподобных миРНКаз	36
3.2. Исследование гибридизационных свойств разработанных миРНКаз.....	39
3.2.1. Исследование гибридизационных свойств двойных миРНКаз.....	39
3.2.2. Исследование гибридизационных свойств петлеобразующих миРНКаз	41
3.2.3. Исследование гибридизационных свойств крабоподобных миРНКаз.....	44
3.2.4. Исследование гибридизационных свойств вилокподобных миРНКаз	45
3.3. Исследование каталитической активности и нуклеотидной специфичности разработанных миРНКаз	47
3.3.1. Исследование рибонуклеазной активности двойных миРНКаз.....	47
3.3.2. Исследование рибонуклеазной активности петлеобразующих миРНКаз	52
3.3.3. Исследование рибонуклеазной активности крабоподобных миРНКаз.....	56
3.3.3. Исследование рибонуклеазной активности вилокподобных миРНКаз	61
3.4. Исследование эффективности расщепления микроРНК-мишеней под действием комбинации миРНКаз и РНКазы H1	66

3.4.1. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии двойных миРНКаз и РНКазы Н1	67
3.4.2. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии петлеобразующих миРНКаз и РНКазы Н1	70
3.4.3. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии крабоподобных миРНКаз и РНКазы Н1	73
3.4.4. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии вилкоподобных миРНКаз и РНКазы Н1	78
3.5. Исследование устойчивости разработанных миРНКаз к действию внутриклеточных нуклеаз.....	81
3.5.1. Исследование нуклеазоустойчивости крабоподобных миРНКаз	81
3.5.3. Исследование нуклеазоустойчивости вилкоподобных миРНКаз.....	82
3.6. Исследование биологической активности и терапевтического потенциала миРНКаз на опухолевых моделях in vitro и in vivo.	83
3.6.1. Исследование биологической активности крабоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток in vitro.....	84
3.6.2. Исследование биологической активности вилкоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток in vitro.....	89
3.6.3. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.....	93
3.6.4. Исследование противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.....	95
ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы исследования и степень её разработанности

В последние десятилетия наблюдается значительный рост интереса исследователей к созданию высокоселективных РНК-направленных препаратов, обеспечивающих направленную регуляцию экспрессии генов. Динамичное развитие данного направления обусловлено достижениями в области геномных и транскриптомных исследований, позволивших выявить широкий спектр РНК, ассоциированных с патологическими состояниями. Наряду с белок-кодирующими транскриптами особое внимание привлекают некодирующие элементы, среди которых длинные некодирующие РНК, микроРНК, кольцевые РНК, PIWI-взаимодействующие РНК (piРНК) и малые тРНК-производные РНК (tsРНК), которые долгое время рассматривались как инертные продукты транскрипции [1–8]. В настоящее время признана ключевая роль этих молекул в регуляции экспрессии генов и в развитии различных заболеваний.

МикроРНК являются одним из наиболее изученных типов некодирующих РНК и представляют собой эндогенные одноцепочечные молекулы длиной 18–25 нуклеотидов, регулирующие посттранскрипционные этапы экспрессии генов. МикроРНК контролируют широкий спектр биологических процессов, включая метаболический гомеостаз, клеточный цикл, пролиферацию, морфогенетическую дифференцировку, запрограммированную клеточную гибель и межклеточные взаимодействия [9–11]. Нарушения экспрессии микроРНК ассоциированы с развитием множества патологий, таких как неврологические расстройства, воспалительные и аутоиммунные состояния, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания [12–15]. В зависимости от роли в канцерогенезе микроРНК подразделяют на онкосупрессорные и онкогенные [16]. Уровень онкосупрессорных микроРНК значительно снижен при опухолевых процессах, в результате чего происходит повышение уровня экспрессии их генов-мишеней, стимулирующих злокачественный рост. Онкогенные микроРНК, напротив, гиперэкспрессированы при злокачественной трансформации и подавляют онкосупрессорные гены-мишени. В связи с этим, онкогенные микроРНК представляют собой клинически значимые мишени для разработки перспективных противоопухолевых стратегий.

На сегодняшний день предложен ряд подходов для подавления избыточной экспрессии и функции микроРНК. Разработанные стратегии различаются по механизмам действия и включают как методы, направленные на предотвращение биогенеза микроРНК, так и стратегии блокирования их функциональной активности. Для подавления патологических микроРНК на уровне биогенеза применяют низкомолекулярные ингибиторы ферментов процессинга микроРНК [17–19] и систему CRISPR/Cas 9 для редактирования генома вблизи локусов, кодирующих микроРНК-предшественники [20–22]. Принципиально иной подход основан на

применении микроРНК-маскирующих олигонуклеотидов, связывающихся с 3'-нетранслируемым участком мРНК, для предотвращения взаимодействия микроРНК с её мРНК-мишенью [23,24]. Широкое применение получили также стратегии прямого ингибирования зрелых форм микроРНК. Эти подходы включают использование микроРНК-направленных антисмысловых олигонуклеотидов, блокирующих функцию микроРНК посредством формирования комплементарного комплекса с микроРНК-мишенью [25–32], микроРНК-спонжей, представляющих собой мультимерные конструкции, содержащие множественные сайты связывания микроРНК [33–39], а также малых РНК-зипперов – олигонуклеотидных последовательностей, тандемно связывающих 3'- и 5'-концы двух микроРНК с образованием расширенного дуплекса с несколькими копиями микроРНК [40].

Перспективным направлением в развитии анти-микроРНК терапии является разработка и применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, адресованных к микроРНК – миРНКаз. миРНКазы представляют собой конъюгаты, состоящие из адресующего олигонуклеотида и ковалентно присоединенной группы, катализирующей расщепление РНК-мишени. В качестве каталитического домена могут выступать остатки имидазола, производные аминов и короткие пептиды [41–46]. В отличие от действия подавляющего большинства антисмысловых олигонуклеотидов, вызывающих обратимое стерическое блокирование РНК-мишени, сайт-специфические миРНКазы могут иметь преимущество за счет способности инициировать многооборотную реакцию инактивации целевой РНК и вызывать более эффективное и необратимое подавление множественных копий РНК. Несмотря на достигнутые успехи в области разработки сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, примеры их эффективного применения для инактивации клинически значимых микроРНК в эукариотических клетках пока единичны [45,47]. В связи с этим, создание микроРНК-направленных искусственных рибонуклеаз, способных эффективно снижать патологически высокие уровни онкогенных микроРНК, представляет собой актуальную задачу.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлась разработка и исследование биологических свойств микроРНК-специфических искусственных рибонуклеаз (миРНКаз) различной структуры для создания эффективных инструментов инактивации онкогенных микроРНК. В ходе работы решали следующие задачи:

1. Дизайн и оптимизация структурных вариантов микроРНК-специфических искусственных рибонуклеаз на основе анализа их гибридизационных свойств для направленного расщепления функционально значимых доменов онкогенных микроРНК;
2. Сравнительный анализ каталитической активности и нуклеотидной специфичности разработанных серий миРНКаз с оценкой кинетических параметров расщепления;

3. Оценка потенцирующего действия комбинации разработанных миРНКаз и РНКазы Н1 на эффективность расщепления микроРНК-мишеней;
4. Исследование биологической активности и терапевтического потенциала миРНКаз на опухолевых моделях *in vitro* и *in vivo*.

1.2. Научная новизна полученных результатов

В рамках работы впервые разработаны несколько типов сиквенс-специфических миРНКаз различной структуры, направленных к различным функциональным областям микроРНК. Установлено, что каталитическая активность сконструированных соединений существенно зависит от общей конфигурации, структуры и длины распознающих доменов, количества и способа присоединения пептидных компонентов. Продемонстрировано, что структуры миРНКаз с терминальным присоединением пептидов к 5'- и 3'-концам олигонуклеотидного домена (крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы), обеспечивающие образование протяженного гетеродуплекса длиной не менее 13 нуклеотидов превосходят по активности конструкции, в которых пептид интегрирован внутрь олигонуклеотидной последовательности и формирующих более короткие дуплексные участки (двойные и петлеобразующие). В рамках данного исследования впервые разработаны миРНКазы с двумя каталитическими пептидами (петлеобразующие, крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы) и установлено, что введение второго пептида приводит к существенному усилению эффективности расщепления микроРНК-мишеней, при этом синергический характер усиления определяется взаимным расположением каталитических доменов.

Принципиальной особенностью разработанных нуклеаз является их двойная функциональность: конъюгаты обладают не только собственной каталитической активностью, но и способностью формировать гетеродуплексы с микроРНК, выступающие в качестве субстратов для РНКазы Н1. Показано, что подход кооперативного применения миРНКаз и РНКазы Н1 обеспечивает синергетическое расщепление целевой микроРНК по всем функциональным доменам. Структурные варианты миРНКаз, формирующие неразрывный гетеродуплекс с микроРНК и характеризующиеся терминальным расположением каталитических пептидов (крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы) продемонстрировали максимальную эффективность в условиях комбинированного действия с РНКазой Н1.

Впервые продемонстрирована прямая корреляция между рибонуклеазной активностью миРНКаз, степенью подавления микроРНК в опухолевых клетках и противоопухолевым эффектом на мышах.

1.3. Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в создании научных основ конструирования эффективных сиквенс-специфических миРНКаз. Разработаны миРНКазы с оптимизированной структурной организацией, учитывающий структурные особенности распознающего олигонуклеотидного домена, специфичность нацеливания на функциональные области микроРНК, а также оптимальные варианты интеграции и позиционирования каталитических пептидных компонентов. Установленные закономерности «структура-активность» формируют теоретическую основу для создания искусственных рибонуклеаз с прогнозируемыми свойствами.

Практическая значимость работы заключается в разработке эффективных препаратов для подавления онкогенных микроРНК. Высокая биологическая активность разработанных миРНКаз *in vitro* и выраженный противоопухолевый эффект *in vivo* демонстрируют их потенциал в качестве перспективных средств таргетной терапии, основанной на специфическом воздействии на онкогенные микроРНК. Разработанные подходы к конструированию искусственных рибонуклеаз могут быть успешно адаптированы для создания препаратов, направленных на подавление других типов РНК, включая короткие рРНК, tsRNAs, а также мРНК и длинные некодирующие РНК.

1.4. Апробация работы и публикации

По результатам исследования опубликовано 16 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях из перечня ВАК и 12 тезисов международных и всероссийских конференций.

Статьи

1. Patutina O.A., **Chiglintseva D.A.**, Bichenkova E.V., Gaponova S.K., Mironova N.L., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Dual miRNases for triple incision of miRNA target: Design concept and catalytic performance // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 10. P. 1–23. Doi: 10.3390/molecules25102459. IF – 4.6. SJR – Q1.
2. Patutina O.*, **Chiglintseva D.***, Amirloo B., Clarke D., Gaponova S., Vlassov V., Bichenkova E., Zenkova M. Bulge-Forming miRNases Cleave Oncogenic miRNAs at the Central Loop Region in a Sequence-Specific Manner // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 12. P. 6562. Doi: 10.3390/ijms23126562. IF – 5.6. SJR – Q1.
3. **Chiglintseva D.**, Clarke D. J., Sen'kova A., Heyman T., Miroshnichenko S., Shan F., Vlassov V., Zenkova M., Patutina O., Bichenkova E. Engineering supramolecular dynamics of self-assembly and turnover of oncogenic microRNAs to drive their synergistic destruction in tumor models // *Biomaterials*. 2024. Vol. 309. P. 122604. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2024.122604. IF – 12.8. SJR – Q1.

4. **Chiglintseva D.**, Patutina O., Zenkova M. Endogenous ribonucleases: therapeutic targeting of the transcriptome through oligonucleotide-triggered RNA inactivation. // *Biomolecules*. 2025. Vol. 15, 7. P. 965. Doi: 10.3390/biom15070965. IF – 4.8. SJR – Q1.

1.5. Личный вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Синтез и полная характеристика миРНКаз была проведена к.б.н. Патутиной О.А., Bahareh Amirloo и Tomas Heuman в Университете Манчестера (Манчестер, Великобритания) под руководством проф. Е.В. Биченковой. МикроРНК были синтезированы к.х.н. Мещаниновой М. И. в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН. Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Катионные липосомы F синтезированы под руководством д.х.н. Маслова М.А. в Российском технологическом университете МИРЭА. Эксперименты по динамике роста опухоли были проведены совместно с к.б.н. Патутиной О.А. и к.м.н. Сеньковой А. В. в Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН. Гистологический анализ проведен к.м.н. Сеньковой А.В. Анализ биораспределения и конфокальная микроскопия проведены Гладких Д.В. и к.б.н. Марковым О.В, соответственно, в Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В работе использовали N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), трис-(оксиметил)-аминометан (Tris), персульфат аммония (PSA) (ICN, США); этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), мочеви́на, борная кислота ("MP Biomedicals", США); имидазол (Fluka, Швеция); фенол (Ambion, США); акриламид, фико́лл, культуральную среду Дульбекко в кодификации Игла (DMEM), культуральную среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), бикарбонат натрия, бычьё эмбриональную сыворотку (БЭС) (Sigma-Aldrich, США); среду Opti-MEM, обезжиренное сухое молоко, TRIzol (Invitrogen, США); этиловый и изопропиловый спирт, цитрат натрия, хлороформ, ацетон, бромфеноловый синий (Реахим, Россия); ксиленцианол (Serva, Германия); перхлорат лития (Sigma-Aldrich, США); раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) (Биохимик, Россия); парафин HISTOMIX, формалин (BioVitrum, Россия); RIPA-буфер, моноклональными первичные антитела к белкам PDCD4 (ARG42238, Arigobio, Тайвань), GAPDH (A19056, ABclonal, Китай), E2F1 (ARG59557, Arigobio, Тайвань), E-кадгерину (AF0131, Affinity Biosciences, США), Ki-67 (ab16667, Abcam, США), каспазе-3 (ab2302, Abcam, США) и вторичные антитела HRP-conjugated goat anti-rabbit (ab6721, Abcam, Великобритания); ферменты: полинуклеотидкиназа T4, рибонуклеаза H1, рибонуклеаза T1 (ThermoScientific, США), ОТ набор с обратной транскриптазой M-MuLV-RN и ПЦР набор HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс, Россия).

2.1.2. Оборудование

В работе были использованы: центрифуги MiniSpin Plus Eppendorf, Eppendorf 5415R (Eppendorf, Германия); магнитная мешалка MR 3001 (Heidolph, Германия); вортекс Reaxtop (Heidolph, Германия); микротермостат модели 208 (БИС-Н, Россия); система очистки воды Milli-Q (Millipore, США), камера для полиакриламидного электрофореза (Helicon, Россия); камера для полиакриламидного электрофореза (Kodak, США); вакуумная сушка для гелей (Labconco, США); система гель документации PharosFX Plus (Bio-Rad, США); источник питания Power-pac 3000 (Bio-Rad, США); амплификатор в режиме реального времени Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США); амплификатор Mastercycler Pro (Eppendorf, Германия); спектрофотометр NanoDrop OneC и Multiscan FC (ThermoScientific, США); pH-метр (Orion 410A, США); гомогенизатор FastPrep-24TM 5G с адаптером QuickPrep 24 (MP Biomedicals, Индия); прибор для электропереноса Criterion Blotter (Bio-Rad, США); система визуализации iBright 1500 (Thermo Fisher Scientific,

США); in система vivo визуализации IVIS Lumina X5 (Revvity, США); счётчик клеток и анализатор их жизнеспособности TC20 (Bio-Rad, США); клеточный анализатор в режиме реального времени xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, Inc., США); микроскоп Zeiss Primo Vert, Axiostar Plus с камерой AxioCam MRc5, LSM 710 (Zeiss, Германия); криостат Microm HM 505N (Thermo Fisher Scientific, США); Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США).

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: Adobe Photoshop CS3, QuantityOne v.4.6.5, OriginPro 2015, GelPro 4, RTCA Software 2.0, GraphPad Prism 8.4.3.

2.1.3. Олигонуклеотиды и миРНКазы

МиРНК-17, миРНК-18a, миРНК-21, миРНК-21_1 и миРНК-155 (Таблица 1), содержащие ОН-группу на 5'-конце, были синтезированы к.х.н. Мещаниновой М. И. в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800 ("Биоссет", Россия) и очищены гель-электрофорезом в денатурирующих условиях.

Таблица 1. Последовательности миРНК, использованные в работе.

миРНК	Последовательность 5'→3'
миРНК-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
миРНК -18a	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUUA
миРНК -21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
миРНК -21_1	UAGCUUAUCAUACAGAUGUUGA
миРНК -155	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU

Исследованные в работе миРНКазы были синтезированы к.б.н. Патутиной О.А., Bahareh Amirloo и Tomas Neuman в лаборатории профессора Биченковой Е.В. в Университете Манчестера (Манчестер, Великобритания). Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН с помощью стандартного фосфитамидного метода и выделены с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Последовательности миРНКаз и олигонуклеотидов приведены в **Таблице 2**.

Таблица 2. Последовательности миРНКаз и олигонуклеотидов, используемых в работе.

Название	Последовательность 5'→3'
Двойные миРНКазы (DC)	
21-DC	ТСА*А*СА*ТС–линкер 1–ПЕП–линкер 2–ГА*ТА*А*ГСТА
18a-DC	ТА*ТСТГС–линкер 1–ПЕП–линкер 2–АТГСА*ССТТА
17-DC	СТА*ССТГС–линкер 1–ПЕП–линкер 2–ААГСА*СТТТГ
155-DC	АССССТА*Т–линкер 1–ПЕП–линкер 2–ТТА*ГСА*ТТА*А
Одинарные миРНКазы (SC)	
21-SC	ПЕП–линкер 2–ГА*ТА*А*ГСТА
18a-SC	ПЕП–линкер 2–АТГСА*ССТТА

17-SC	ПЕП–линкер 2–AAGCA*CTTTG
155-SC	ПЕП–линкер 2–TTA*GCA*TTA*A
Двойные олигонуклеотиды (D-ON)	
21-D-ON	TCAACATC–(ТЭГ) ₂ –GATAAGCTA
18a-D-ON	TATCTGC–(ТЭГ) ₂ –ATGCACCTTA
17-D-ON	CTACCTGC–(ТЭГ) ₂ –AAGCACTTTG
155-D-ON	ACCCSTAT–(ТЭГ) ₂ –TTAGCATTA
Петлеобразующие миРНКазы (BC)	
17-BC-α	CTACCTGCAC – dR ^α (ПЕП) – AAGCACTTTG
17-BC-β	CTACCTGCAC – dR ^β (ПЕП) – AAGCACTTTG
17-BC-αα	CTACCTGCAC – [dR ^α (ПЕП)] ₂ – AAGCACTTTG
17-BC-ββ	CTACCTGCAC – [dR ^β (ПЕП)] ₂ – AAGCACTTTG
21-BC-α1	TCAACATCAGT – dR ^α (ПЕП) – ATAAGCTA
21-BC-α2	TCAACATCAG – dR ^α (ПЕП) – GATAAGCTA
21-BC-β1	TCAACATCAGT – dR ^β (ПЕП) – ATAAGCTA
21-BC-β2	TCAACATCAG – dR ^β (ПЕП) – GATAAGCTA
Петлеобразующие олигонуклеотиды (B-ON)	
17-B-ON	CTACCTGCAC–dR–AAGCACTTTG
21-B-ON	TCAACATCAGT–dR–ATAAGCTA
Крабоподобные миРНКазы (CC)	
21-CC-αα	ПЕП–dR ^α – ATCAGTCTGATAA– dR ^α –ПЕП
21-CC-ββ	ПЕП–dR ^β – ATCAGTCTGATAA– dR ^β –ПЕП
21-CC-pp	ПЕП–Линкер 3 –p–ATCAGTCTGATAA– p Линкер 1–ПЕП
21-CC-5'p	ПЕП–Линкер 3 –p–ATCAGTCTGATAA
21-CC-3'p	ATCAGTCTGATAA–p –Линкер 1–ПЕП
21-CC-5'α/21-CC-3'α*	ПЕП–dR ^α – ATCAGTCTGATAA– dR ^α и dR ^α – ATCAGTCTGATAA– dR ^α –ПЕП
17-CC-αα	ПЕП–dR ^α – TGCACGTAAAGCA– dR ^α –ПЕП
17-CC-5'α/17-CC-3'α*	ПЕП–dR ^α – TGCACGTAAAGCA– dR ^α и dR ^α – TGCACGTAAAGCA– dR ^α –ПЕП
Крабоподобные неспецифические конъюгаты и олигонуклеотиды	
Scr-CC-αα	ПЕП–dR ^α – CAAGTCTCGTATG– dR ^α –ПЕП
Scr-C-ON-αα	dR ^α – CAAGTCTCGTATG– dR ^α
Крабоподобные олигонуклеотиды (C-ON)	
21-C-ON	ATCAGTCTGATAA
17-C-ON	TGCACGTAAAGCA
Вилкоподобные миРНКазы (FC)	
21-FC-ар	ПЕП– (ПЕП–Линкер 3)– dR ^α – AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC
21-FC-βp	ПЕП– (ПЕП–Линкер 3)– dR ^β – AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC
21-FC-α/21-FC-p*	ПЕП– (Линкер 3)– dR ^α – AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC и (ПЕП–Линкер 3)– dR ^α – AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC
21-FC-β/21-FC-p*	ПЕП– (Линкер 3)– dR ^β – AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC и (ПЕП–Линкер 3)– dR ^β – AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC
Вилкоподобные неспецифические конъюгаты	
Scr-FC-βp	ПЕП– (ПЕП–Линкер 3)– dR ^β – CAAGTCTCGTATGTGTCAGCGAAAGCTGAC

Вилкоподобные олигонуклеотиды (F-ON)	
21-F-ON	AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC
Cy5.5-21-F-ON	Cy5.5- AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC

ПЕП – каталитический пептид [GRLRL]₂. Линкер 1 – 3'-6-амино-2-(гидроксиметил)гексильный линкер (–CH₂–CH(CH₂OH)–(CH₂)₄–NH–), Линкер 2 – тиогексильный линкер, TEG – триэтиленгликолевый линкер, Линкер 3 – аминогексильный линкер (–NH–(CH₂)₆–). Подчёркнутое основание – 2-аминодезоксиаденозин. dR^α и dR^β – остаток рибозы, к которому в С1' положении через аминогексильный линкер (линкер 3) присоединён каталитический пептид в альфа или бета положении. р-фосфатная группа распознающего олигонуклеотида. * – побочные продукты синтеза, представляющие собой смесь двух олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с одним пептидом. А* – 2-аминоаденин. Подчеркнутая последовательность – последовательность шпилечной структуры.

Последовательности специфических праймеров для реакции обратной транскрипции и количественной ПЦР указаны в **Таблице 3** и **Таблице 4**, соответственно.

Таблица 3. Последовательности специфических к миРНК шпилечных праймеров, использованных для реакции обратной транскрипции.

Обозначение специфических праймеров	Последовательность 5'→3'
<i>RT-mir-17</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACC TACCTGCAC
<i>RT-mir-18a</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACT ATCTGCACT
<i>RT-mir-21</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACT CAACATCAG
<i>RT-mir-155</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACA CCCCTATCA
<i>RT-let7g</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACA ACTGTACAA
<i>RT-U6</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACA AAAATATGGAACG

Синим цветом выделена последовательность нуклеотидов, комплементарная 3'-району миРНК; зеленым цветом выделена последовательность петли, красным цветом выделена последовательность стебля.

Таблица 4. Последовательности специфических праймеров, использованных в работе для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Обозначение специфических праймеров	Последовательность 5'→3'
<i>mir-18a-F</i>	GCGTAAGGTGCATCTAGTG
<i>mir-17-F</i>	AGACAAAGTGCTTACAGTGC
<i>mir-21-F</i>	AGACTAGCTTATCAGACTGA
<i>mir-155-F</i>	ACTTAATGCTAATTGTGATAGG
<i>miR-let7g-F</i>	AACGCTGAGGTAGTAGTTTGT
<i>U6-F</i>	CTCGCTTCGGCAGCACA
<i>Universal-R</i>	GTGCAGGGTCCGAGGT

2.1.4. Буферы и растворы

Т4-ПНК-буфер	50 мМ Трис-НСl, pH 7.6, 10 мМ MgCl ₂ , 5 мМ DTT, 0.1 мМ спермидин
TBE	0.089 М Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na ₂ EDTA
Буфер I	50 мМ Трис-НСl, pH 7.0, 200 мМ KCl, 0.1 мМ EDTA
Буфер II	20 мМ Трис-НСl, pH 7.8, 40 мМ KCl, 8 мМ MgCl ₂ , 1 мМ DTT
Буфер D	6 М мочевины, 25 мМ цитрат натрия, pH 4.8, 1 мМ EDTA, 100 мкг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i>
Буфер E	2 М имидазол, pH 7.0, 1мМ EDTA, 250 мкг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i>
Буфер L	2% SDS, 10% глицерин, 5% β-меркаптоэтанол, 0.002% бромфенол, 0.0625 М Трис-НСl (pH 6.8)
Буфер ТВ	47.9 мМ Трис (pH 8.3), 38.6 мМ глицин, 0.1% SDS, 10% этанол
Буфер TBST	137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na ₂ HPO ₄ , 1.8 мМ K ₂ HPO ₄ (pH 7.4), 0.1% Tween 20
Буфер TGB	25 мМ Трис (pH 8.3), 0.25 М глицин, 0.1% SDS
ОТ-буфер	50 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 75 мМ KCl, 3 мМ MgCl ₂
ПЦР-буфер	10 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 50 мМ KCl, 1.2 мМ MgCl ₂
Раствор M	8 М мочевины, 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.025%-ный ксиленианол
Раствор F	20%-ный Ficoll-400 в воде, 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.025%-ный ксиленианол

Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали воду, очищенную на установке MilliQ фирмы “MilliPore” (США). Все буферы и растворы подвергали стерилизации автоклавированием или фильтрацией через нитроцеллюлозный фильтр 0.22 мкм (“MilliPore”, США).

2.1.5. Трансфицирующие агенты

Для трансфекции клеток соединениями использовали трансфицирующий агент Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, США) и фолат-содержащие катионные липосомы F [48], синтезированные под руководством д.х.н., проф. Маслов М.А. в Российском технологическом университете МИРЭА (Москва).

2.1.6. Клеточные культуры

Клетки меланомы мыши B16 cells были получены из банка клеточных культур Национального медицинского исследовательского центра онкологии им Блохина Н.Н (Москва). Клетки карциномы легких человека A-549, клетки аденокарциномы молочной железы человека

MCF-7 и клетки эпидермоидной карциномы человека KB-3-1 и KB-8-5 были получены из банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Нетрансформированные клетки фибробластов человека hFF3 были любезно предоставлены д.б.н. Коваль О.А., Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% БЭС и 1% раствор антибиотиков и антимикотиков (0.1 мкг/мл стрептомицина, 100 ед./мл пенициллина и 25 мкг/мл амфотерицина), при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Клетки пересеивали раз в 3-4 дня для поддержания экспоненциального роста.

2.1.7. Лабораторные животные

В работе использовали 10-12-недельных мышей линии nude, которые содержались со стандартным 12ч циклом день/ночь, регулируемом автоматически. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Экспериментальный протокол был одобрен Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 111 от 7 Декабря 2021 г).

2.2. Методы

2.2.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в нативных условиях

Электрофорез проводили в нативном 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) при соотношении акриламид/N,N'-метиленабисакриламид = 29/1 в буфере TBE при 4 °С при напряженности электрического поля 10-20 В/см в течение 2-3 ч.

2.2.2. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Электрофорез проводили в 12%-ном или 18%-ном ПААГ при соотношении акриламид/N,N'-метиленабисакриламид = 19/1 в присутствии 8 М мочевины в буфере TBE при напряженности электрического поля 30-45 В/см.

2.2.3. Введение радиоизотопной метки в состав микроРНК с использованием полинуклеотидкиназы

Введение радиоизотопной метки γ -[³²P] по 5'-ОН микроРНК проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0.2 мКи γ -[³²P]-АТР, 10 ед. акт. Т4 полинуклеотидкиназы, 4 мкг микроРНК и Т4-ПНК-буфер при 4 °С в течение ночи. 5'-[³²P]-микроРНК выделяли с помощью электрофореза в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. По окончании электрофореза полосы геля, содержащие меченые микроРНК, визуализировали с помощью радиоавтографии и вырезали из геля. Меченую микроРНК элюировали в 300 мкл 0.3 М NaAc, pH 5.2, в присутствии 15%-ного фенола, затем осаждали 3-4 объемами этилового спирта при -20 °С

в течение 18 ч. Раствор центрифугировали при 13000 об/мин в течение 15 мин, осадок промывали 3-4 объемами этилового спирта, высушивали, растворяли в воде и хранили при -20°C .

2.2.4. Гибридизация олигонуклеотидов и миРНКаз с микроРНК

Гибридизацию проводили в реакционной смеси, объемом 4 мкл, содержащей 100 имп/мин $5'-[^{32}\text{P}]$ -микроРНК, микроРНК в концентрации 1 мкМ, олигонуклеотид или миРНКазу в концентрации 0.1-10 мкМ в буфере I или буфере II при температуре 37°C в течение 45 мин. Реакцию останавливали добавлением 4 мкл раствора F и анализировали методом задержки в 15%-ном нативном ПААГ. Непосредственно после остановки реакции образцы вносили в гель идущего электрофореза с интервалом 1 мин. Анализ проводили, как описано в п. 2.2.9.

2.2.5. Расщепление микроРНК с помощью миРНКаз или олигонуклеотидов

Расщепление РНК под действием миРНКаз или олигонуклеотидов исследовали в условиях однооборотной и многооборотной реакций. Реакционную смесь, содержащую 80 имп/мин на одну пробу $5'-[^{32}\text{P}]$ -меченой микроРНК, микроРНК в концентрации 1 мкМ и миРНКазу или олигонуклеотид в концентрации 5, 20 мкМ (однооборотная реакция) или микроРНК в концентрации 10 мкМ и миРНКазу в концентрации 5 мкМ (многооборотная реакция) в буфере I или буфере II инкубировали при 37°C в течение 0-72 ч. Аликвоты объемом 2 мкл отбирали в определенные временные точки. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного объема 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 мин, высушивали и растворяли в растворе М. В качестве контроля инкубировали реакционную смесь того же состава в отсутствие миРНКаз и олигонуклеотидов. Продукты гидролиза анализировали с помощью электрофореза в 18%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Соотнесение сайтов гидролиза проводили сравнением с продуктами статистического гидролиза этой же РНК под действием РНКазы T1 и 2 М имидазола (п. 2.2.8.). Анализ реакции проводили, как описано в п. 2.2.9.

2.2.6. pH-зависимое расщепление микроРНК под действием двойных миРНКаз

pH-зависимое расщепления миРНК-17 и миРНК-18а под действием двойных миРНКаз изучали в диапазоне pH от 3.7 до 9.5 в буферных растворах, содержащих 100 мМ KCl, 1мМ DTT, 2 мМ MgCl_2 и компонент с перекрывающимися значениями pH: 50 мМ ацетат натрия с pH 3.7–5.0; 50 мМ MES-HCl с pH 4.5–6.0; 50 мМ бис-трис-пропан-КОН с pH 6.0–9.5; 50 мМ Tris-HCl с pH 7.0–9.0. Реакционную смесь (8 мкл), содержащую 320 имп/мин $5'-[^{32}\text{P}]$ -микроРНК, микроРНК в концентрации 1 мкМ и миРНКазу 17-DC в концентрации 10 мкМ или 18а-DC в концентрации 20 мкМ в одном из буферов инкубировали при 37°C в течение 48 ч. В качестве контроля микроРНК

инкубировали в отсутствие миРНКаз в буфере, содержащем Tris-HCl с pH 7.0. Продукты гидролиза анализировали, как описано в п. 2.2.9.

2.2.7. Расщепление микроРНК под действием миРНКаз в присутствии фермента РНКазы Н1

Реакционную смесь, содержащую 80 имп/мин на одну пробу 5'-[³²P]-микроРНК, микроРНК в концентрации 1 мкМ и миРНКазу или олигонуклеотид в концентрации 20 мкМ (однооборотная реакция) или микроРНК в концентрации 10 мкМ и миРНКазу или олигонуклеотид в концентрации 5 мкМ (многооборотная реакция) в буфере II инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Затем добавляли РНКазу Н1 до итоговой концентрации в растворе 5 или 100 ед. акт./мл и продолжали инкубировать при 37°С в течение 0-72 ч. Аликвоты объемом 2 мкл отбирали через 1-72 ч после добавления фермента. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного объема 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 мин, высушивали и растворяли в растворе М. В качестве контроля инкубировали реакцию смесь того же состава в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие олигонуклеотида и миРНКазы. Продукты гидролиза анализировали, как описано в п. 2.2.5 и 2.2.9.

2.2.8. Частичный гидролиз микроРНК в денатурирующих условиях

Для определения сайтов гидролиза при расщеплении микроРНК под действием миРНКаз в качестве маркеров использовали частичные гидролизаты микроРНК, полученные в денатурирующих условиях (лэддер).

Т1-лэддер

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 5'-[³²P]-микроРНК (1000 имп/мин) и 9 мкл буфера D, инкубировали при 55 °С в течение 10 мин, затем при 0 °С в течение 1 мин. После денатурации к пробе микроРНК добавляли 5 ед. акт. РНКазы Т1 и вновь инкубировали при 55°С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 10×ТВЕ.

Имидазольный лэддер

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 5'-[³²P]-микроРНК (1000 имп/мин) и 9 мкл буфера Е, инкубировали при 90 °С в течение 30 мин. По окончании реакции пробы осаждали 10-кратным объемом 2%-ного перхлората лития в ацетоне, осадок отделяли центрифугированием при 13000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 мин, высушивали и растворяли в растворе М.

2.2.9. Анализ эффективности гибридизации и расщепления микроРНК

После проведения реакции гибридизации или расщепления гели высушивали в вакуумной системе при 80°C в течение 2 ч и сканировали с помощью системы гель-документации Pharos FX Plus. Полученные после сканирования изображения анализировали с помощью программ QuantityOne v.4.6.5 и OriginPro 2015.

Степень связывания миРНКаз с микроРНК определяли как отношение интенсивности полосы комплекса микроРНК-миРНКазы к сумме интенсивностей полос, соответствующих комплексу и несвязанной микроРНК. Степень расщепления микроРНК определяли, как отношение суммарной интенсивности полос образовавшихся фрагментов микроРНК к суммарной интенсивности всех фрагментов, включая нерасщепленную миРНК. Накопление отдельного фрагмента расщепленной микроРНК оценивали как отношение интенсивности полосы фрагмента к суммарной интенсивности всех фрагментов, включая нерасщепленную микроРНК.

Константу комплексообразования рассчитывали по формуле:
$$K_a = \frac{\alpha}{[BC]_0 (1-\alpha) \left(1 - \alpha \left(\frac{[miR]_0}{[miRNase]_0} \right) \right)},$$

где α доля связанной РНК; $[miR]_0$ и $[miRNase]_0$ исходные концентрации микроРНК и миРНКазы, соответственно.

Наблюдаемую константу скорости реакции k_{obs} рассчитывали по формуле:

$F(t) = \alpha \times (1 - e^{-k_{obs} \cdot t})$, где $F(t)$ доля субстрата, расщепленного к моменту времени t ; t – время; α – максимальное расщепление.

Период полурасщепления микроРНК определяли по формуле $\tau_{1/2} = \ln 2 / k_{obs}$

2.2.10. Нуклеазоустойчивость миРНКаз и олигонуклеотидов в ростовой среде

Реакционную смесь объемом 90 мкл, содержащую миРНКазы или олигонуклеотиды в концентрации 0.1 мкг/мл, ростовую среду DMEM с 10 или 50% бычьей эмбриональной сывороткой (БЭС), инкубировали при 37 °C в течение 24-72 ч. Аликвоты объемом 10 мкл отбирали через 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 и 72 ч инкубации. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 8 М мочевины и замораживали в жидком азоте. Продукты реакции анализировали в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Гель окрашивали с помощью Stains-All и визуализировали при помощи системы iBright 1500 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.11. Приготовление комплексов катионных липосом и нуклеиновых кислот

В исследованиях на культурах клеток трансфекцию миРНКаз или олигонуклеотидов проводили с помощью коммерческого агента Lipofectamine™2000 (LF). Формирование липоплексов проводили путём инкубации LF в среде Opti-MEM при комнатной температуре в течение 5 мин, с последующим смешиванием с равным объёмом раствора олигонуклеотидов или

миРНКаз в среде Opti-MEM и инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре. После чего липоплексы добавляли к клеткам. Крабоподобные миРНКазы использовали в концентрации 1 мкМ, а вилкоподобные миРНКазы – в концентрации 10-200 нМ для теста на пролиферацию и 50 нМ для ПЦР и теста на миграцию.

Для исследования противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз *in vivo* использовали фолат-содержащие катионные липосомы F. Комплексообразование миРНКаз и липосом F проводили при соотношениях N/P (количество азотов катионного липида и липида-хэлпера липосом и фосфоров нуклеиновых кислот) 2/1, 4/1 или 6/1. Приготовление липоплексов проводили путём смешивания липосом F и миРНКаз в среде Opti-MEM с последующей инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре. После чего липоплексы вводили животным.

2.2.12. Трансфекция клеток олигонуклеотидами и миРНКазами

Трансфекцию клеток MCF-7, A-549, B16, hFF3, KB-3-1 и KB-8-5 проводили в присутствии трансфецирующего агента Lipofectamine™2000 согласно протоколу производителя. За день до трансфекции клетки высаживали в планшеты в среде, не содержащей сыворотки и антибиотиков. Приготовление липоплексов проводили как описано в п. 2.2.11. Трансфекцию клеток проводили в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37 °C в течение 4 ч, после чего среду в каждой лунке заменяли на культуральную среду DMEM, содержащую 10%-ную БЭС и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика, и инкубировали при 37 °C. Далее клетки использовали непосредственно для проведения тестов либо для выделения суммарной клеточной РНК.

2.2.13. Выделение суммарной клеточной РНК из опухолевых клеток

Суммарную клеточную РНК выделяли из клеток с использованием реагента TRIzol согласно методике фирмы производителя. Для предотвращения деградации РНК все операции проводили во льду. Клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли TRIzol из расчёта 1 мл реагента на 10⁶ клеток. Клетки суспендировали и выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин. Далее к полученной клеточной суспензии добавляли хлороформ в объеме, составляющем 1/5 от объема TRIzola, и инкубировали в течение 2–3 мин при комнатной температуре. Водную фазу отделяли центрифугированием при 12000 об/мин, 4 °C, в течение 15 мин, фазу отбирали, добавляли к ней изопропиловый спирт в объеме, составляющем 1/2 от объема TRIzola, и инкубировали при –20°C 18 ч. Осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин, 4 °C, в течение 20 мин, промывали 75%-ным этанолом, высушивали, растворяли в воде, хранили при –20 °C. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм. Степень чистоты РНК определяли по поглощению на длинах волн 260 и 280 нм и расчёту

соотношения 260/280. Для реакции обратной транскрипции были использованы образцы с соотношением 260/280 не менее 1.8.

2.2.14. Определение уровня экспрессии микроРНК в опухолевых клетках методом количественной ОТ-ПЦР

Определение уровней микроРНК в клетках после трансфекции миРНКазми или олигонуклеотидами проводили методом обратной транскрипции с использованием специфических к микроРНК шпилечных праймеров с последующей количественной полимеразной цепной реакцией (“stem-loop PCR”) [49]. Последовательности праймеров для реакций обратной транскрипции и количественной ПЦР указаны в **Таблице 3** и **Таблице 4**, соответственно.

2.2.14.1. Обратная транскрипция

Для синтеза кДНК использовали суммарную РНК клеток, выделенную, как описано в п. **2.2.14.** кДНК получали в реакционной смеси объемом 30 мкл, содержащей ОТ-буфер, 3 мкг суммарной клеточной РНК, 0.2 мМ специфического праймера (**Таблица 3**) и 1.5 единиц обратной транскриптазы М-MuLV-RN (Биолабмикс, Россия). Перед реакцией праймеры инкубировали при 75 °С в течение 5 мин и далее при 0°С в течение 1 мин. Синтез кДНК проводили в следующих условиях: 1 цикл – 16 °С, 30 мин; 40 циклов – 30 °С, 30 сек, 42 °С, 30 сек, 50 °С, 30 сек. По окончании реакции обратную транскриптазу инактивировали в течение 1 цикла 85 °С, 5 мин. Объем полученной кДНК доводили до 300 мкл.

2.2.14.2. ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических шпилечных праймеров

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкл полученной кДНК, 5 мкл 1мМ специфических праймеров (**Таблица 4**) и 10 мкл ПЦР-буфера (краситель SYBR Blue). Амплификацию проводили в следующих условиях: 1 цикл – 95 °С, 5 мин; 35 циклов – 95 °С, 15 сек; 60 °С, 30 сек; 70 °С, 40 сек, 75 °С, 10 сек. Регистрирование данных реакции в режиме реального времени проводили, начиная с 75 °С в течение 10 сек. Данные для кривой плавления продуктов ПЦР реакции фиксировали в течение 81 цикла с интервалом 0.5 °С, начиная с 55 °С до 95 °С. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Относительный уровень микроРНК определяли методом $\Delta\Delta C_T$ с нормализацией по мяРНК U6.

2.2.15. Исследование влияния миРНКаз и олигонуклеотидов на пролиферацию клеток методом WST

Опухолевые клетки B16, MCF-7, A-549 и нетрансформированные клетки фибробластов hFF3 высаживали в 96-лучночные планшеты по 5×10^3 клеток на лунку. На следующие сутки проводили трансфекцию крабоподобными миРНКазми в концентрации 1 мкМ в комплексе с Lipofectamine™2000 как описано в п. 2.2.11 и 2.2.12. Через 4 ч после трансфекции среду в лунках заменяли средой DMEM, содержащей 10%-ную БЭС и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Через 72 ч инкубации в каждую лунку добавляли реагент WST-1 в объеме 1/10 от объема клеточной среды. Затем клетки B16 и A-549 инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, а клетки MCF-7 и hFF3 в течение 2 ч и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн 450 и 620 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan FC (“Thermo Scientific”, США).

2.2.16. Исследование влияния миРНКаз на пролиферацию клеток методом МТТ-теста

Опухолевые клетки KB-8-5, KB-3-1, A-549, MCF-7 и нетрансформированные клетки фибробластов hFF3 высаживали в 96-лучночные планшеты по 5×10^3 клеток на лунку. На следующие сутки проводили трансфекцию вилкоподобными миРНКазми в концентрации 10-200 нМ в комплексе с Lipofectamine™2000 как описано в п. 2.2.11 и 2.2.12. Через 4 ч после трансфекции среду в лунках заменяли средой DMEM, содержащей 10%-ную БЭС и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Через 72 ч инкубации среду отбирали и к клеткам добавляли раствор МТТ до конечной концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3 ч в тех же условиях. Среду удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн 570 и 630 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan FC (“Thermo Scientific”, США). Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

2.2.17. Исследование влияния миРНКаз на пролиферацию клеток в режиме реального времени с помощью системы xCelligence

Исследование пролиферации клеток MCF-7 и A-549 регистрировали в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence (ACEA Biosciences, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Для этого опухолевые клетки высаживали в 16-ти луночные планшеты E-Plate по 5×10^3 клеток на лунку. На следующие сутки проводили трансфекцию клеток крабоподобной миРНКазой в концентрации 1 мкМ в комплексе с Lipofectamine™2000 как описано в п. 2.2.11 и 2.2.12. Через 4 ч после трансфекции среду в лунках заменяли средой DMEM, содержащей 10%-ную БЭС и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Эксперименты по пролиферации клеток проводили в течение 96 ч, клеточный индекс регистрировался каждые 30 мин в течение всей продолжительности эксперимента.

2.2.18. Определение уровня белков-мишеней микроРНК в опухолевых клетках и опухолевой ткани методом Вестерн блот гибридизации

Для приготовления лизата опухолевые клетки MCF-7 в культуральных планшетах промывали стерильным физиологическим раствором, а затем лизировали в буфере RIPA в объёме 100 мкл. Фрагменты опухоли KB-8-5 гомогенизировали в 500 мкл буфера RIPA с добавлением 1 г лизирующей матрицы с помощью гомогенизатора FastPrep-24TM 5G с адаптером QuickPrep 24 (MP Biomedicals, Индия). Затем супернатант отбирали и хранили при -20°C.

К полученному лизату (10 мкл) добавляли равный объём буфера L, прогревали в течение 10 мин при 95 °C и проводили белковый электрофорез. Разделение белков осуществляли в 12.5% ПААГ, содержащем додецилсульфат натрия (SDS) в буфере TGB при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 1 ч. После электрофореза белки переносили на мембрану Immobilon-P PVDF (Merck, США) в буфере TB с применением мокрого элетроблоттинга Criterion Blotter (Bio-Rad, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител, мембрану после переноса инкубировали в течение 1 ч в 5% обезжиренном сухом молоке, растворённом в буфере TBST. Далее мембраны выдерживали при +4 °C в течение 18 ч с первичными моноклональными антителами к белкам PDCD4 (ARG42238, Arigobio, Тайвань; 1/800), GAPDH (A19056, ABclonal, Китай; 1/8000), E2F1 (ARG59557, Arigobio, Тайвань; 1/400), Е-кадгерин (AF0131, Affinity Biosciences, США; 1/1000), разведёнными в 5% обезжиренном сухом молоке в TBST. По окончании инкубирования мембрану промывали в буфере TBST 3 раза по 10 мин и переносили в раствор со вторичными антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (ab6721, Abcam, Великобритания). Через 1 ч мембрану промывали в буфере TBST 3 раза по 10 минут. Люминисцентную детекцию проводили с помощью готового раствора субстрата для пероксидазы хрена ("Abcam", Великобритания) на приборе iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ интенсивности полос определяли с помощью системы iBright Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.19. Исследование миграционной активности опухолевых клеток методом Scratch теста

Клетки эпидермоидной карциномы человека KB-8-5 высаживали в 6-ти луночные планшеты по 10^6 клеток на лунку в среде IMDM, не содержащей антибиотиков. На следующие сутки проводили трансфекцию клеток миРНКазми как описано в п. 2.2.11 и 2.2.12. В течение эксперимента клетки инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Через 24 ч после трансфекции в каждой лунке с клеточным монослоем наносили три вертикальных «царапины» с помощью наконечника микропипетки, затем клетки промывали стерильным физиологическим раствором и инкубировали в прежних условиях в течение 72 ч. Через 0, 24, 48 и 72 ч клетки фотографировали с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert (Zeiss, Германия) на 4-кратном увеличении. Фотографии

клеток обрабатывали с помощью программы ImageJ. Степень зарастания царапины (v) оценивали по формуле $v = (1-X) \times 100\%$, где X – отношение ширины царапины через 24, 48 и 72 ч к ширине царапины в 0 ч.

2.2.20. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз *ex vivo*

Для оценки противоопухолевого эффекта крабоподобных миРНКаз подготовили четыре группы клеток линии MCF-7: (1) интактные клетки; (2) клетки, трансфицированные контрольным конъюгатом Scr-CC- $\alpha\alpha$; (3) клетки, трансфицированные миРНКазой 21-CC-pp; (4) клетки, трансфицированные миРНКазой 21-CC- $\alpha\alpha$. Трансфекцию проводили с использованием Lipofectamine™2000 при концентрации миРНКазы 1 мкМ согласно протоколу в п. 2.2.11 и 2.2.12. Через 4 ч после трансфекции культуральную среду удаляли, клетки промывали и добавляли к ним физиологический раствор для последующей имплантации мышам линии nude. Клетки MCF-7 (10^6 клеток в 0,1 мл стерильного физиологического раствора) подкожно трансплантировали мышам в область левого бока ($n=7$ мышей в группе) для развития солидной опухоли. После того как опухоли начинали пальпироваться, каждые 2–3 дня измеряли их объем с использованием штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = (D \times d^2)/2$, где D – наибольший диаметр опухолевого узла, d – наименьший диаметр опухолевого узла, перпендикулярный D . На 19-е сутки мышей выводили из эксперимента, опухоли были отобраны для дальнейшего гистологического анализа

2.2.21. Исследование биораспределения вилкоподобного олигонуклеотида *in vivo*

Анализ биораспределения Cy5.5-меченого вилкоподобного олигонуклеотида в мышах-опухоленосителях линии nude был проведен Д.В. Гладких (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН). Для этого животным ($n=3$ в группе) подкожно трансплантировали клетки эпидермоидной карциномы KB-8-5 человека (10^6 кл в 100 мкл физиологического раствора/мышь). После формирования опухоли (через 12 дней) мышам перитюморально (в объеме 100 мкл) вводили Cy5.5-21-F-ON (10 мкг/мышь) в комплексе с катионными липосомами F при соотношениях N/P 2/1, 4/1 и 6/1. Через 24, 48, 96 и 144 ч после инъекции животных подвергали анестезии изофлураном и выполняли одновременно рентгеновскую съемку (время экспозиции 15 с) и регистрацию флуоресценции в ближней инфракрасной области (NIRF) (длины волн 620 и 700 нм, время экспозиции 10 с) с помощью системы *in vivo* визуализации IVIS Lumina X5 (Revvity, США). Через 192 ч мышей выводили из эксперимента и измеряли интенсивность флуоресценции опухоли и внутренних органов, включая легкие, сердце, печень, селезенку и почки. Совмещение слоев изображений выполняли в программе Adobe Photoshop CS3 (Adobe, США).

2.2.22. Конфокальная микроскопия криосрезов опухоли

Через 24 ч после введения Су5.5-меченного 21-F-ON в опухоли мышей в эксперименте по биораспределению, опухоль немедленно замораживали в растворе Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США) в жидком азоте. Образцы хранили при -70°C до момента обработки. Срезы толщиной 10 мкм готовили с использованием криостата Microm HM 505N (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре -21°C . Криосрезы окрашивали DAPI (Thermo Fisher Scientific, США), разведенном в PBS 1/100, в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали PBS. Окрашивание цитоскелета проводили с использованием реагента CytoPainter Phalloidin-iFluor 488 (ab176753, Abcam, Великобритания) в соответствии с протоколом производителя. Затем срезы помещали в среду ProLong Gold Antifade Mountant (Life Technologies, США).

Криосрезы исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с объективами Plan-Apochromat $10\times/0.45$ и Plan-Apochromat $63\times/1.40$ Oil DIC. Съемку образцов проводили в трёх каналах: синий канал (лазер 405 нм, фильтр 410–495 нм) для визуализации ядер, окрашенных DAPI; зелёный канал (лазер 488 нм, фильтр 493–630 нм) для визуализации актиновых филаментов, окрашенных Phalloidin-iFluor 488; красный канал (лазер 633 нм, фильтр 656–759 нм) для визуализации Су5.5-меченного 21-F-ON. Конфокальные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ZEN Black Edition v. 8.1 (Zeiss, Германия).

2.2.23. Противоопухолевая активность вилкоподобных миРНКаз *in vivo*

Для исследования противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз использовали ксенографтную модель карциномы человека KB-8-5 у мышей линии nude. Опухоли формировали путем подкожного введения клеток KB-8-5 (10^6 клеток, 0.1 мл стерильного физиологического раствора) в область левого бока. На 7-е сутки после формирования опухолей мыши были случайно разделены на 3 группы ($n=5$ в группе): (1) контроль – мышам вводили Opti-MEM; (2) мышам вводили 5 мкг контрольного конъюгата Scr-FC- $\beta\beta$; (3) мышам вводили 5 мкг миРНКазы 21-FC- $\beta\beta$. Образование комплексов F с миРНКазами проводили в соотношении N/P = 2/1 как описано в п. 2.2.11, а затем поэритиоморально вводили три инъекции с интервалом три дня, на 7, 11 и 15 дни. Объем опухоли измеряли каждые 2-3 дня с использованием штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = (D \times d^2)/2$, где D – наибольший диаметр опухолевого узла, d – наименьший диаметр опухолевого узла, перпендикулярный D. На 21 день, мышей выводили из эксперимента, опухоли и внутренние органы, включая печень и почки, были отобраны для дальнейшего гистологического анализа.

2.2.24. Гистологический анализ опухолевых тканей

Гистологический анализ тканей опухоли, печени и почек мышей линии nude после введения миРНКаз *ex vivo* или *in vivo* был проведен к.м.н. А.В. Сеньковой (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН). Для этого образцы опухолей, почек и печени животных, полученных после эксперимента *ex vivo* и *in vivo*, обезвоживали последовательной инкубацией в возрастающих концентрациях этанола и ксилола, а затем погружали в парафин HISTOMIX (BioVitrum, Россия). Парафиновые срезы опухолей и внутренних органов толщиной 5 мкм, полученные с использованием микротомы Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США), окрашивали гематоксилином и эозином для последующего микроскопического исследования. Тонкие срезы опухолей для иммуногистохимических исследований (3-4 мкм) извлекали из парафина и регидратировали для последующей инкубации со специфическими антителами к Ki-67 (ab16667, Abcam, США), каспазе-3 (ab2302, Abcam, США) или PDCD4 (ARG42238, Arigobio, Тайвань) согласно протоколу производителя. Полученные образцы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Spring Bioscience detection system, США), добавляли готовый раствор субстрата для пероксидазы хрена, а затем окрашивали гематоксилином Майера. Изображения образцов получали с помощью микроскопа Axiostar Plus, дополненным Axiocam MRc5 камерой (Zeiss, Германия) ($\times 400 \times$ увеличение). Морфометрический анализ выполняли с использованием счётной сетки, содержащей 100 тестовых точек в исследуемой области площадью $3,2 \times 10^6$ мкм². Анализ включал определение численной плотности (Nv) митозов и каспаза-3-позитивных клеток, а также объёмной плотности (Vv, %) Ki-67-позитивных клеток. Для каждой группы исследовали не менее пяти случайных полей зрения из опухолевых образцов семи мышей из эксперимента *ex vivo* (всего 35 полей) или пяти мышей из эксперимента *in vivo* (всего 25 полей).

2.2.25. Статистический анализ данных

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием двустороннего непарного критерия Стьюдента (t-теста) или однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с применением апостериорного критерия множественных сравнений Тьюки. Значения $p < 0.05$ считали статистически значимыми. Для анализа использовали программное обеспечение GraphPad Prism версии 8.4.3 (GraphPad Software, США).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Дизайн микроРНК-направленных искусственных рибонуклеаз

МикроРНК являются ключевыми регуляторами посттранскрипционной экспрессии генов, реализующими свою функцию в составе нуклеопротеинового комплекса miRISC (от англ. miRNA-induced silencing complex). Взаимодействие miRISC с мРНК-мишенями опосредуется комплементарным связыванием микроРНК с 3'-нетранслируемой областью мРНК, что запускает один из трёх основных путей посттранскрипционной регуляции: эндонуклеолитическое расщепление мРНК с помощью белка AGO2, репрессию трансляции или деаденилирование с последующей деградацией мРНК [50,51].

В последовательности микроРНК выделяют 4 функциональных домена, которые обеспечивают ее биологическую активность посредством координированного поэтапного функционирования: затравочная область (2 – 8 н., от англ. seed region), центральная петля (9 – 13 н., от англ. central loop), 3'-область дополнительных взаимодействий (13-16 н., от англ. region of 3'-supplementary interaction) и терминальная область (17 – (21– 23)), от англ. terminal region) [52–54]. Затравочная область и 3'-область дополнительных взаимодействий являются ключевыми для обеспечения специфичности связывания микроРНК с мРНК-мишенью. После формирования комплекса центральная петля и терминальная область микроРНК обеспечивают формирование конформации, необходимой для эффективного подавления мРНК [50–52,55,56]. Основным требованием для AGO2-опосредованного расщепления мРНК является образование комплементарных пар оснований одновременно и в затравочной области, и в 3'-области дополнительных взаимодействий. Образование дуплекса только в затравочной области, а также наличие дополнительных комплементарных пар в 3'-области дополнительных взаимодействий инициирует AGO2-опосредованную регуляцию, включая репрессию трансляции и деградацию мРНК, то есть без эндонуклеотического расщепления [51]. Протяженное спаривание оснований в 3'-терминальной области микроРНК в сочетании с миссмахами в центральной области инициирует внутренний процесс утилизации микроРНК, называемый TDMD (от англ. Target-Directed MicroRNA Decay), который приводит к деградации самой микроРНК [51,57–59]. Таким образом, функциональные области микроРНК обеспечивают не только эффективность взаимодействия с мРНК, но и баланс между различными механизмами посттранскрипционной регуляции.

Ранее в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН совместно с Университетом Манчестера были сконструированы и исследованы сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы, направленные к онкогенным микроРНК miРНК-17 и miРНК-21. Разработанные miРНКазы представляли собой конъюгаты, состоящие из адресующего

шпилечного олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного 5'-концу микроРНК-мишени, и пептида на основе чередующихся остатков лейцина и аргинина (LR)₄ или (LRLRG)₂ [45,46]. Было показано, что разработанные соединения осуществляют эффективное сиквенс-специфическое расщепление 3'-терминальной области микроРНК-мишеней, что приводит к их ингибированию в опухолевых клетках и обеспечивает выраженный противоопухолевый эффект *in vitro* и *in vivo* [32,45,46].

В данной работе были сконструированы и исследованы четыре серии миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз новой структуры, направленных к различным функциональным областям микроРНК – двойные миРНКазы DC (от англ. Dual conjugate) с каталитическим пептидом, расположенным между двумя короткими распознающими доменами и способным расщеплять микроРНК в ее центральной области и в 3'-области дополнительных взаимодействий (Рис. 1 А); петлеобразующие миРНКазы BC (от англ. Bulge-forming conjugate) с одним или двумя каталитическими пептидами, расположенными в составе внутреннего участка распознающего олигонуклеотида, для разрушения мишени в её центральной области (Рис. 1 Б); крабоподобные миРНКазы CC (от англ. Crab-like conjugate), в которых два каталитических пептида расположены по концам короткой адресующей компоненты для расщепления микроРНК, как в затравочной области, так и в 3'-терминальной области (Рис. 1 В); и вилкоподобные миРНКазы FC (от англ. Fork-like conjugate), в которых два каталитических пептида присоединены по 5'-концу шпилечного олигонуклеотида для расщепления в 3'-области дополнительных взаимодействий и терминальном районе микроРНК-мишени (Рис. 1 Г).

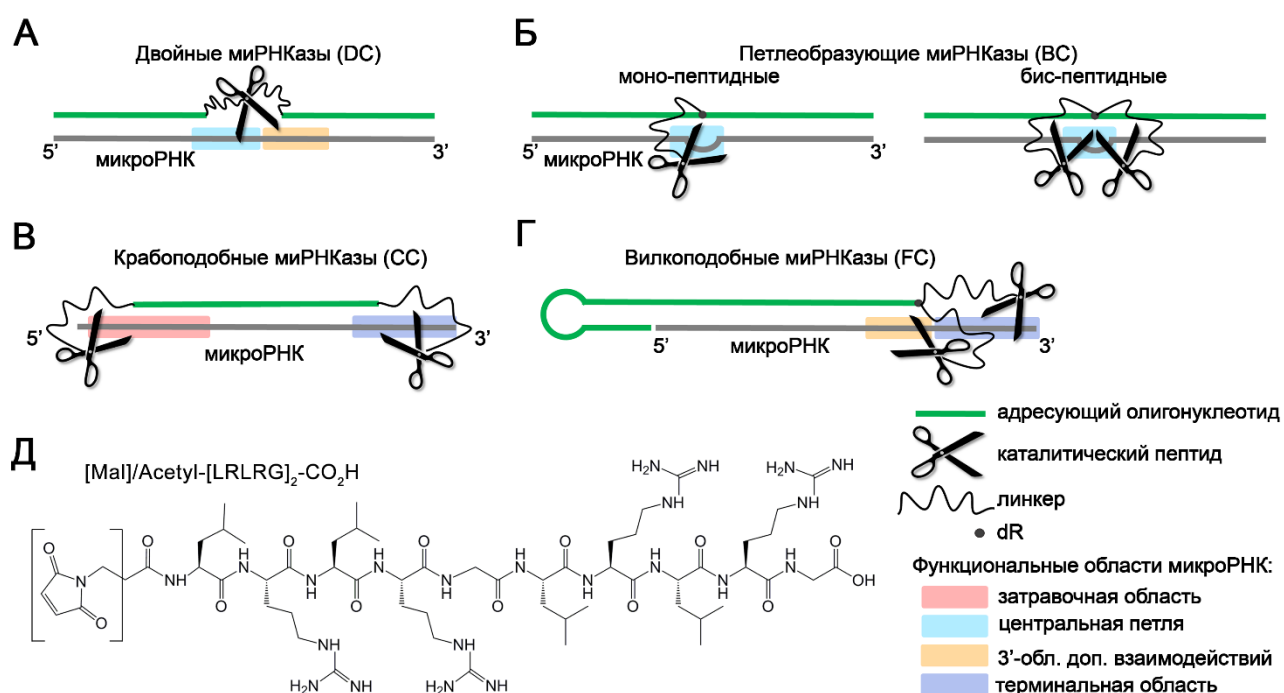


Рис. 1. Схематичное представление комплексов микроРНК с миРНКазами различных серий: двойные (А), петлеобразующие (Б), крабоподобные (В) и вилкоподобные (Г) миРНКазы.

Цветными прямоугольниками выделены функциональные области миРНК, на которые направлено действие каталитических пептидов миРНКаз. Д – химическая структура каталитического пептида (LRLRG)₂, содержащего малеимидную группу (Mal) на N-конце для синтеза двойных конъюгатов или ацетильную группу (Acetyl) для синтеза петлеобразующих, крабоподобных и вилкоподобных миРНКаз.

Олигонуклеотидные компоненты миРНКаз были сконструированы для направленного воздействия на высокоонкогенные микроРНК, в частности на миРНК-21, миРНК-17, миРНК-18a и миРНК-155, ассоциированных с развитием широкого спектра онкологических заболеваний.

В качестве каталитической компоненты в разработанных миРНКазах был использован короткий амфифильный пептид (LRLRG)₂, состоящий из чередующихся основных (аргинин, R) и гидрофобных (лейцин, L) аминокислотных остатков, а также двух остатков глицина (G) для обеспечения конформационной гибкости пептида (**Рис. 1 Д**) [45,60,61].

Синтез и полная характеристика миРНКаз была проведена в Университете Манчестера под руководством проф. Е.В. Биченковой. Химическая структура и чистота полученных соединений, выделенных методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (RP-HPLC), были подтверждены с использованием масс-спектрометрии MALDI-ToF и протонной ЯМР-спектроскопии ¹H NMR.

3.1.1. Дизайн двойных миРНКаз

Впервые структура двойных искусственных рибонуклеаз (DC, от англ. Dual Conjugate) была предложена и апробирована для сиквенс-специфического расщепления модельной тРНК^{Фен} дрожжей [62]. В рамках настоящей работы этот структурный принцип был применен для создания рибонуклеаз, специфически нацеленных на клинически значимые онкогенные миРНК-21, миРНК-18a, миРНК-17 и миРНК-155.

Двойные миРНКазы состояли из двух коротких микроРНК-адресующих олигодезоксирибонуклеотидов А и Б и каталитического пептида, расположенного между ними таким образом, чтобы при связывании с микроРНК образовывался одноцепочечный участок в центральной области мишени длиной 5 н (**Рис. 2; Таблица 2**). Пептид был конъюгирован с олигонуклеотидами путем присоединения N-конца через тиогексильный линкер к 5'-концу олигонуклеотида А и С-конца через 6-амино-2-(гидроксиметил)гексильный линкер к 3'-концу олигонуклеотида Б (**Рис. 2 Б**). Ранее было показано [62], что одноцепочечная область длиной 5 н. обладает достаточной гибкостью, а аминогексильные линкеры обеспечивают необходимую конформационную подвижность пептида для эффективного расщепления РНК. Данный дизайн обеспечивает локализацию пептида напротив центральной области миРНК.

Поскольку дизайн микроРНК-направленных DC предполагает использование коротких распознающих мотивов длиной 7 – 10 н., для увеличения сродства к микроРНК в составе олигонуклеотидов аденины были заменены на 2-аминоаденины (**Рис. 2 В**). Данная модификация

обеспечивает образование трех водородных связей в каждой комплементарной паре оснований, повышая термостабильность дуплекса ДНК/РНК примерно на 3 °С на каждую замененную пару [63,64], тем самым увеличивая общую стабильность гибридизационного комплекса. Дополнительным преимуществом 2-аминоаденина является повышение сиквенс-специфичности: миссматч в положении напротив этого нуклеотида приводит к снижению температуры плавления дуплекса на 7 – 15 °С [65], обеспечивая селективное связывание только с полностью комплементарными мишенями.

В данной работе были сконструированы двойные конъюгаты 17-DC, 18a-DC, 21-DC, 155-DC, направленные к онкогенным микроРНК миРНК-17, миРНК-18a, миРНК-21 и миРНК-155, последовательности и структура которых приведены в **Таблице 2**.

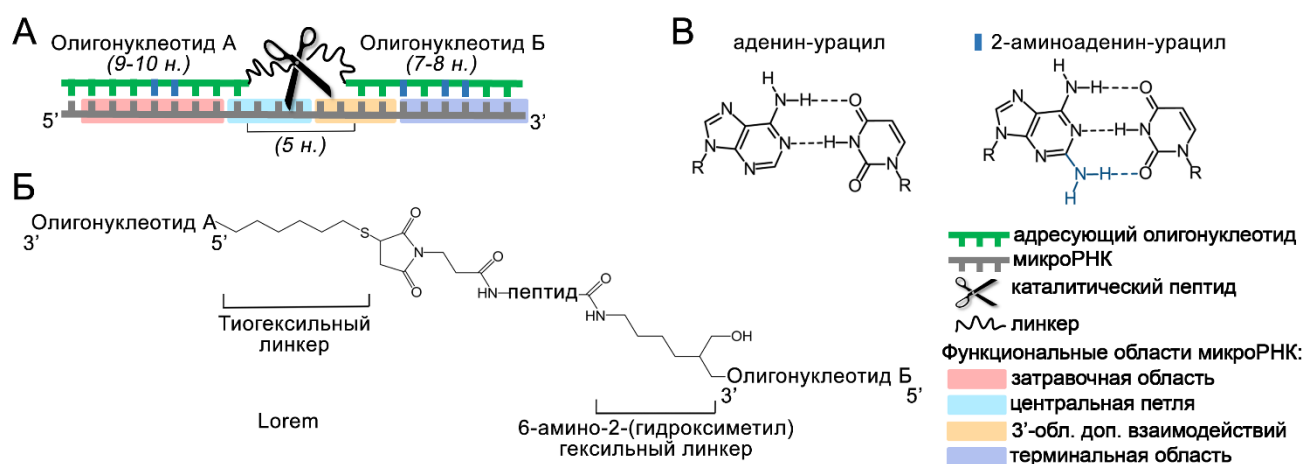


Рис. 2. Дизайн двойных миРНКаз (DC). **А** – структура комплексов DC с онкогенными микроРНК миРНК-17, миРНК-18a, миРНК-21 и миРНК-155. Синим выделены основания 2-аминоаденинов. **Б** – схематичное изображение структуры DC, в которых пептид соединен с двумя олигонуклеотидами посредством тиогексильного и 6-амино-2-(гидроксиметил)гексильного линкеров. Пептид – (LRLRG)₂. **В** – структура пар аденин-урацил и 2-аминоаденин-урацил.

3.1.2. Дизайн петлеобразующих миРНКаз

За последние три десятилетия накоплено большое количество данных, свидетельствующих о повышенной чувствительности петлевых структур РНК к гидролизу под действием различных агентов [66–73]. Однако до недавнего времени эффективность расщепления петлевых участков пептидными искусственными рибонуклеазами не изучалась. Расщепление РНК в области петли под действием различных иРНКаз было всесторонне исследовано на модельном РНК субстрате – тРНК^{Фен} дрожжей [60,74]. Было установлено, что длина петли 3 – 5 н. является оптимальной для обеспечения эффективного расщепления с сохранением высокой эффективности гибридизации. Кроме того, было показано, что в структуре петлеобразующих соединений пространственное положение пептида относительно фосфодиэфирных связей в области петли РНК имеет важное значение. Для обеспечения конформационной гибкости каталитический пептид должен быть присоединён посредством

аминогексильного линкера в α - или β -положении к C1'-атому безосновной дезоксирибозы (далее по тексту – дезоксирибоза) [60]. Дополнительно было установлено, что введение двух каталитических пептидов в структуру конъюгата через два остатка дезоксирибозы значительно повышает скорость расщепления РНК-мишени [75]. В данной работе эта концепция была применена для разработки петлеобразующих миРНКаз (ВС), направленных к терапевтически значимым мишеням – миРНК-21 и миРНК-17.

МикроРНК-направленные ВС представляли собой соединения, состоящие из олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного микроРНК-мишени, при гибридизации с которым в центральной части микроРНК образуется тринуклеотидная петля, и одного или двух пептидов, расположенных напротив формируемой петли (Рис. 3 А; Таблица 2).

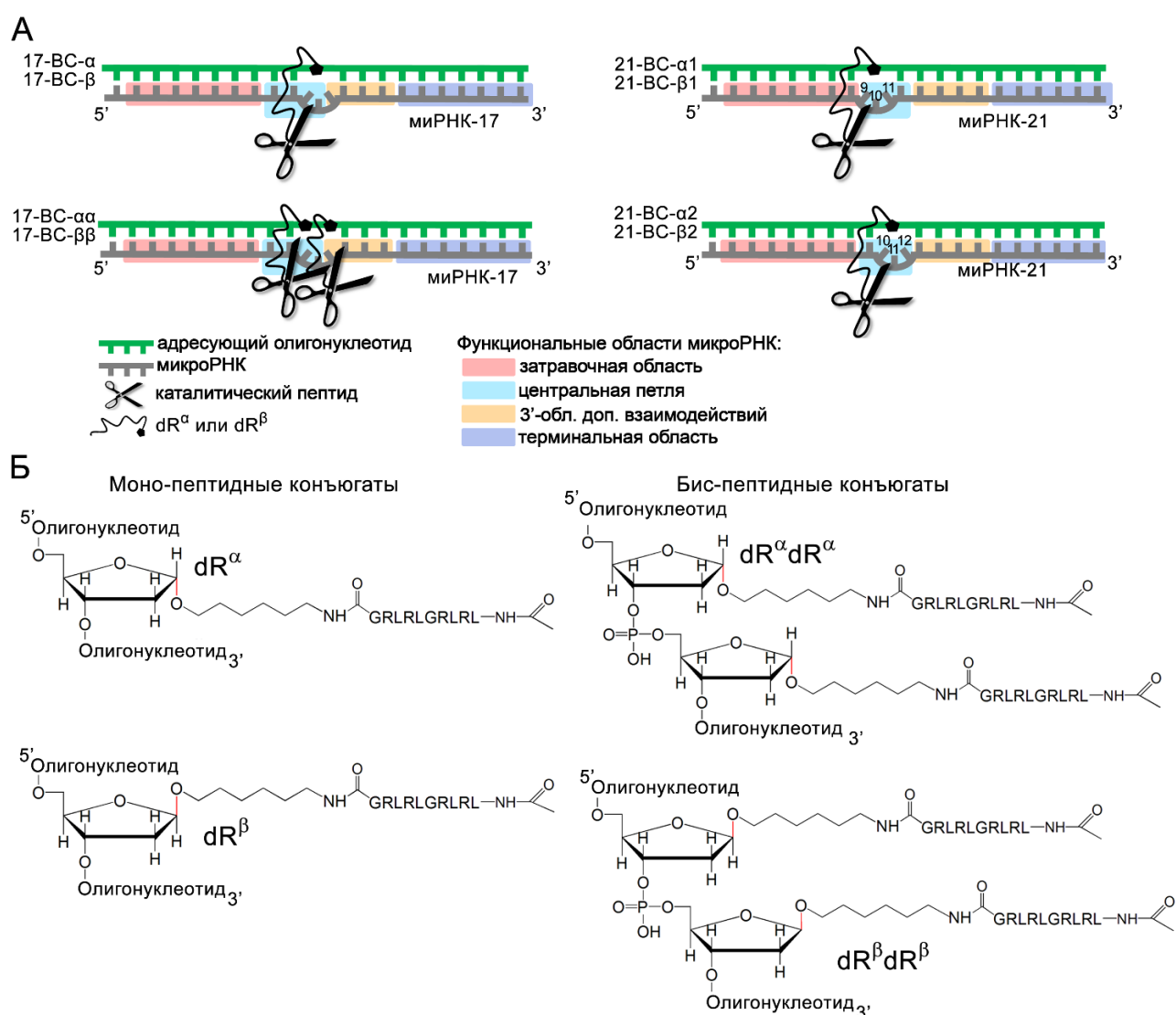


Рис. 3. Дизайн петлеобразующих миРНКаз (ВС). **А** – структура комплексов ВС с онкогенными микроРНК миРНК-17 и миРНК-21. **Б** – схема присоединения пептидов в моно- и бис-пептидных ВС, в которых один или два каталитических пептида Acetyl-(LRLRG)₂-COOH присоединены к олигонуклеотиду через аминогексильный линкер посредством остатка дезоксирибозы в альфа (dR $^{\alpha}$) или бета (dR $^{\beta}$) положении.

Для определения оптимальной структуры олигонуклеотидной компоненты петлеобразующих миРНКаз на первом этапе были рассчитаны термодинамические параметры (ΔG , ΔH и ΔS) и температура плавления (T_m) комплексов распознающих олигонуклеотидов с их миРНК-мишенями с использованием сервиса DINAMelt (www.unafold.org). Примеры предсказанных структур и рассчитанные значения термодинамических параметров представлены на **Рис. 4**. Показано, что полностью комплементарные олигонуклеотиды формируют стабильные дуплексы с миРНК-17 и миРНК-21 с T_m 64.1 и 60.8 °С, соответственно (**Рис. 4 А и Г**). Формирование тринуклеотидной петли при гибридизации миРНК-17 с петлеобразующими олигонуклеотидами 17-В-ОН- α и 17-В-ОН- β способствует дестабилизации дуплекса, снижая T_m почти на 15 °С по сравнению с полностью комплементарным вариантом (**Рис. 4 А и Б**), а для комплексов миРНК-21 с олигонуклеотидами 21-В-ОН- α 1, 21-В-ОН- β 1, 21-В-ОН- α 2 и 21-В-ОН- β 2 наблюдалось ещё более выраженное снижение температуры плавления, на 19 °С (**Рис. 4 Д и Е**). Введение двух остатков дезоксирибозы (dR) в структуру олигонуклеотидов 17-В-ОН- $\alpha\alpha$ и 17-В-ОН- $\beta\beta$ способствовало повышению эффективности гибридизации с микроРНК, предположительно, за счёт снижения конформационного напряжения в области петли (**Рис. 4 В**). Несмотря на заметное снижение T_m комплексов разработанных олигонуклеотидов с мишенями, они способны сохранять достаточную стабильность для функционирования в физиологических условиях.

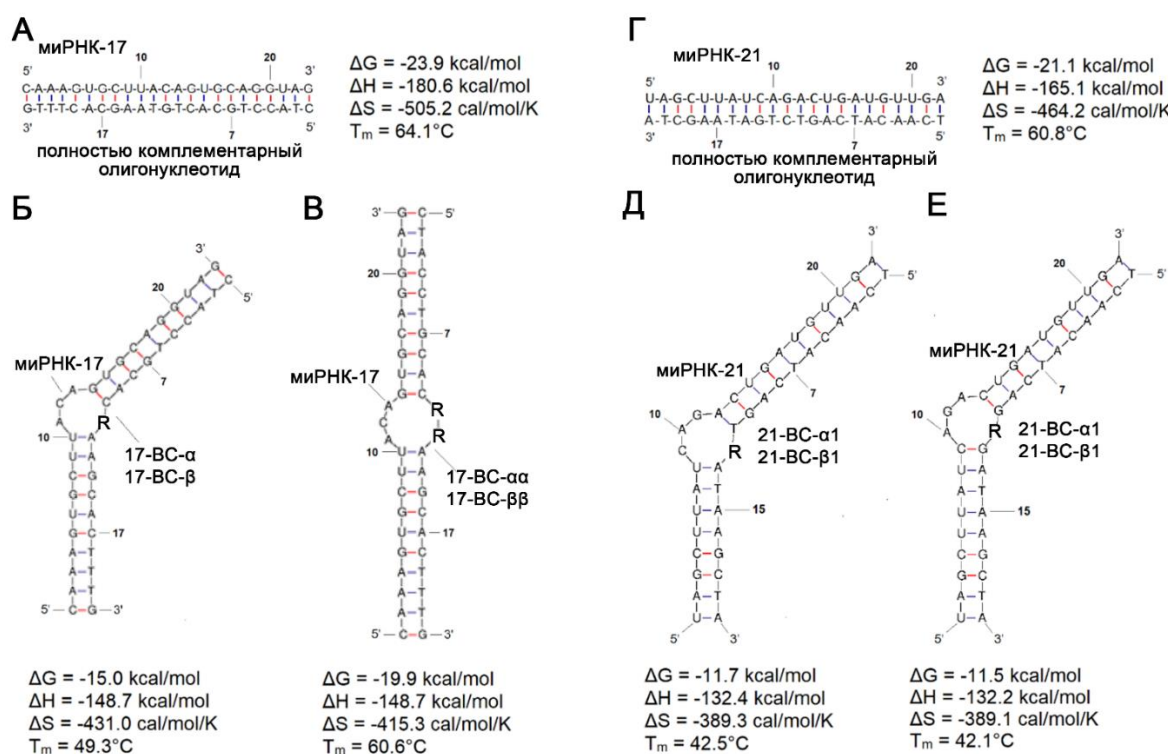


Рис. 4. Предсказанные комплексы последовательностей миРНК-17 (**А – В**) или миРНК-21 (**Г – Е**) с полностью или частично комплементарными к мишеням олигонуклеотидами. Вторичная

структура и термодинамические параметры (T_m , ΔG , ΔH и ΔS) были рассчитаны с использованием сервиса DINAMelt (www.unafold.org). R – остаток дезоксирибозы.

Конъюгирование сконструированных олигонуклеотидов с каталитическим пептидом Acetyl-(LRLRG)₂-COOH осуществляли путем амидного связывания С-концевой карбоксильной группы с аминогруппой аминокислотного линкера. При этом принципиальным аспектом конструирования было варьирование стереохимии присоединения линкера к C1' атому дезоксирибозы в α - или β -конфигурации (dR^α или dR^β) (**Рис. 3 Б**). Такой дизайн обеспечивал возможность оценки влияния различной пространственной ориентации пептида на эффективность расщепления петлевых структур микроРНК.

Таким образом, была разработана серия из восьми петлеобразующих миРНКаз, включающая шесть соединений с одним пептидом (моно-пептидные ВС) и два соединения с двумя пептидами (бис-пептидные ВС) (**Рис. 3**). В частности, было сконструировано две моно-пептидные миРНКазы 17-ВС- α и 17-ВС- β , направленные к миРНК-17, и четыре моно-пептидные миРНКазы 21-ВС- α 1, 21-ВС- β 1, 21-ВС- α 2 и 21-ВС- β 2, направленные к миРНК-21, которые отличались ориентацией пептида (α или β) относительно последовательности мишени. Для изучения специфичности каталитического расщепления РНК петлеобразующими миРНКазами были разработаны конструкции 21-ВС- α 1, 21-ВС- β 1 и 21-ВС- α 2, 21-ВС- β 2, которые отличались положением остатка дезоксирибозы dR в последовательности олигонуклеотида. Так, в миРНКаз 21-ВС- α 1 и 21-ВС- β 1 остаток дезоксирибозы был расположен между 11 и 12 нуклеотидом распознающего домена, что обеспечивало нацеливание пептида на участок C9-A10-G11 в последовательности миРНК-21, а в конструкциях 21-ВС- α 2 и 21-ВС- β 2 остаток дезоксирибозы был смещен на один нуклеотид (между 10 и 11 н.) для нацеливания пептида на петлевой участок A10-G11-A12 (**Рис. 3 А**). Для исследования эффективности расщепления РНК-мишени при совместном действии двух каталитических пептидов было сконструировано две бис-пептидные петлеобразующие миРНКазы 17-ВС- $\alpha\alpha$ и 17-ВС- $\beta\beta$ (**Рис. 3**). Конструкция таких соединений содержала два каталитических пептида, присоединенных в $\alpha\alpha$ - или $\beta\beta$ -ориентации к двум последовательно расположенным остаткам дезоксирибозы.

3.1.3. Дизайн крабоподобных миРНКаз

Для каталитического расщепления микроРНК одновременно в двух концевых функционально значимых областях были разработаны крабоподобные конъюгаты (СС, от англ. Crab-like conjugate), структура которых позволяет разрушать 5'-затравочную и 3'-терминальную области мишени. Нацеливание каталитического пептида на затравочную область является стратегически важным, поскольку именно этот район отвечает за инициацию посттранскрипционной регуляции экспрессии мРНК. Расщепление в 3'-терминальной области микроРНК может способствовать дополнительной дестабилизации функционального комплекса

микроРНК/AGO2 и увеличению скорости расщепления мишени. Разработанные СС были направлены к микроРНК-21 и микроРНК-17.

Крабовидные микроРНКазы были сконструированы на основе укороченного 13-звенного олигонуклеотида (Рис. 5, Таблица 2), что позволяет обеспечить оптимальный баланс между специфичностью связывания с мишенью и способностью к быстрому высвобождению продуктов расщепления для реализации эффективного многооборотного каталитического режима.

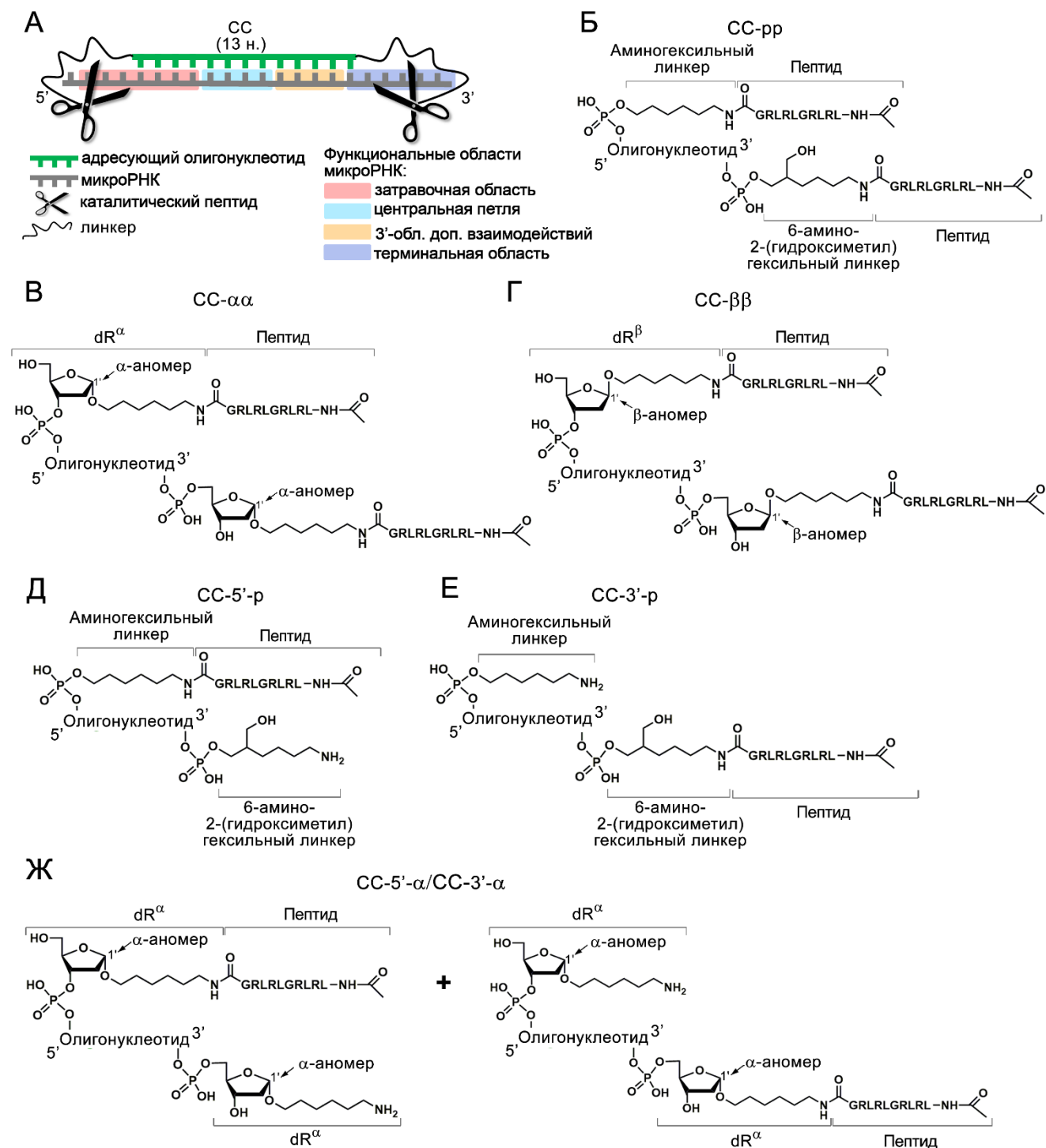


Рис. 5. Дизайн крабовидных микроРНКаз (СС). А – распознающий домен СС (зеленый) связывается с центральной областью микроРНК-мишени, в результате чего затравочная и 3'-

каталитических пептида были ковалентно присоединены к 5'- и 3'-концевым фосфатным группам олигонуклеотида с помощью 5'-аминогексильного (Линкер 1) и 3'-6-амино-2-(гидроксиметил)гексильного (Линкер 3) линкеров, соответственно (**Рис. 5 Б, Таблица 2**). Второй и третий структурные варианты представляли собой миРНКазы, в которых пептиды были ковалентно присоединены к остаткам дезоксирибозы (dR), расположенным на 5'- и 3'-конце распознающего олигонуклеотида, с помощью аминогексильных линкеров, присоединённых к аномерному атому C1' в α - (структурный вариант 2, **Рис. 5 В, Таблица 2**) или β -конфигурации (структурный вариант 3, **Рис. 5 Г, Таблица 2**). Вариант 1 представлен миРНК-21-направленной миРНКазой 21-СС-pp, вариант 2 – крабоподобными миРНКазами 21-СС- $\alpha\alpha$ и 17-СС- $\alpha\alpha$, направленными к миРНК-21 и миРНК-17, соответственно, а вариант 3 – конъюгатом 21-СС- $\beta\beta$, направленным к миРНК-21 (**Таблица 2**).

Для определения вклада бис-пептидной организации в активность крабоподобных миРНКаз были синтезированы моно-пептидные варианты 21-СС-5'p и 21-СС-3'p, в которых каталитический пептид был присоединён к 5'- или 3'-концевой фосфатной группе распознающего олигонуклеотида (**Рис. 5 Д и Е, Таблица 2**).

3.1.4. Дизайн вилкоподобных миРНКаз

Одним из подходов для увеличения стабильности антисмысловых олигонуклеотидов в физиологических условиях без введения химических модификаций является включение шпильчатых структур на 3'-конец олигонуклеотида, характеризующийся повышенной чувствительностью к нуклеазам [76–78]. Согласно литературным данным, наличие двуцепочечного участка или шпильчатой структуры на концах олигонуклеотида, комплементарного микроРНК, не только стабилизирует молекулу в физиологических условиях, но также способствует вытеснению целевой микроРНК из комплекса RISC, повышая эффективность ингибирования [79,80].

Используя данный принцип, в настоящем исследовании была разработана структура вилкоподобных миРНКаз (FC, от англ. Fork-like conjugate), включающая распознающий домен шпильчатой структуры, который ранее использовался в дизайне высокоэффективных миРНКаз, направленных к миРНК-21 [45] (**Рис. 7, Таблица 2**). Олигонуклеотид содержал мини-шпильку с последовательностью GCGAAAGC, обладающую высокой устойчивостью в условиях термической и хаотропной денатурации, и обеспечивающую защиту от действия нуклеаз [81,82]. Для дополнительного повышения стабильности и нуклеазоустойчивости стебель шпильки был удлинен последовательностью случайных нуклеотидов 5'-GTCA. Специфичность распознавания микроРНК-мишени олигонуклеотидом обеспечивалась 14-звенным комплементарным фрагментом (**Рис. 7 А**). Согласно расчётам с использованием сервиса DINAMelt, шпильчатый

олигонуклеотид обладает термодинамической стабильностью с T_m 68.7 °С (Рис. 8). Экспериментально было показано, что температура плавления дуплекса микроРНК/шпилечный олигонуклеотид составляет 54.7 °С, что на 7 °С выше, чем у дуплекса микроРНК с линейным 14-звенным олигонуклеотидом [83]. Таким образом, шпилечная адресующая компонента обеспечивает эффективную гибридизацию и стабилизацию комплементарного комплекса с микроРНК-мишенью. Разработанный олигонуклеотид связывается с микроРНК в 5'-затравочной области и в области центральной петли миРНК-21, при этом для атаки каталитическими пептидами доступны 3'-область дополнительных взаимодействий и терминальная область (Рис. 7 А).

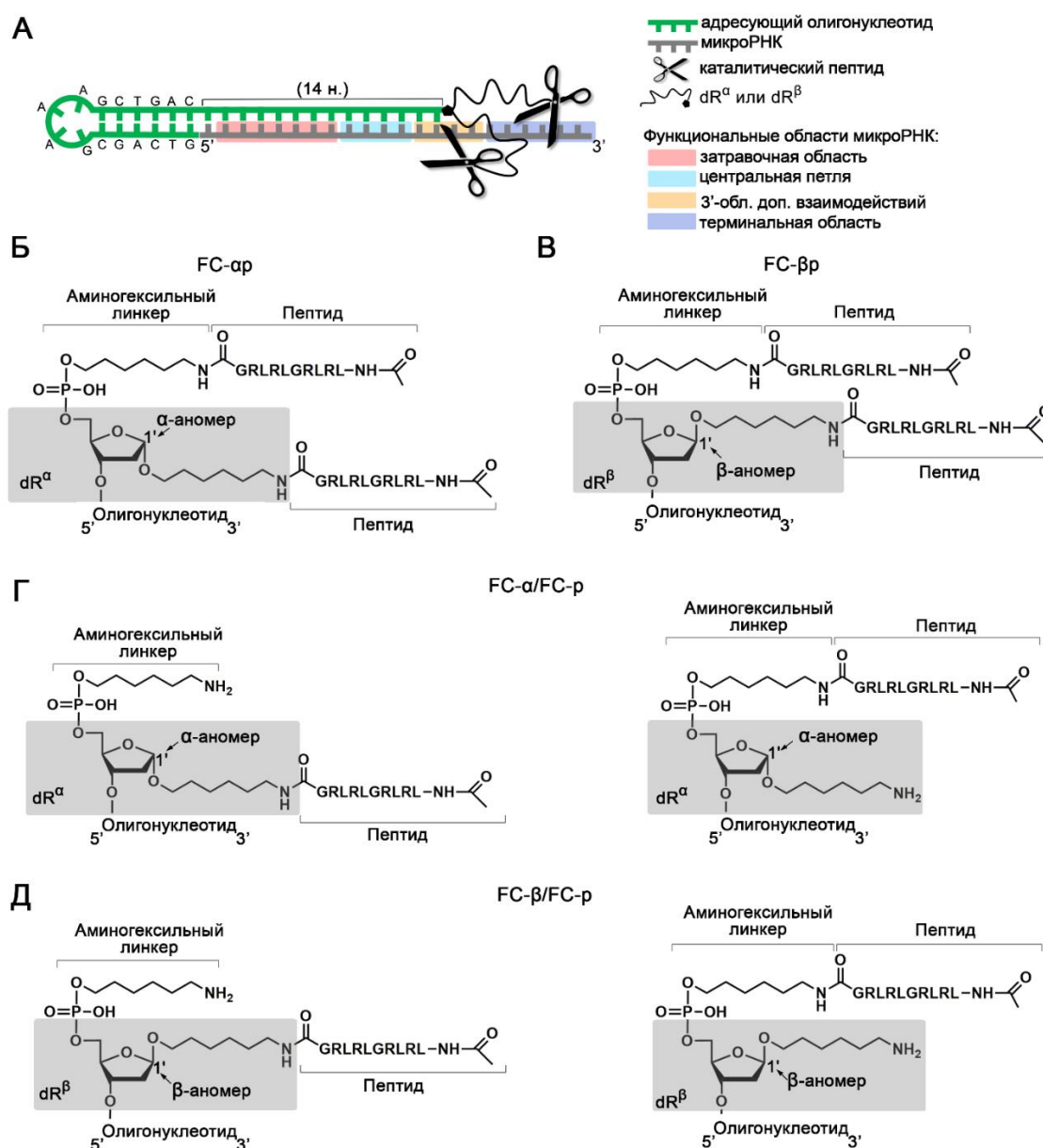


Рисунок 7. Структура вилокотипных миРНКаз (FC). **А** – шпилечный распознающий домен миРНКазы (зеленый) связывается с миРНК-мишенью (серый), при этом 3'-концевая область микроРНК остается одноцепочечной и доступной для расщепления двумя каталитическими

пептидами (ножницами), расположенными на 5'-конце миРНКазы. **Б, В** – схема присоединения пептида в миРНКаз 21-FC- α p (**Б**) и 21-FC- β p (**В**). Первый пептид присоединён через С-концевой остаток глицина посредством аминоксильного линкера к 5'-фосфатной группе остатка дезоксирибозы. Второй пептид присоединен посредством аминоксильного линкера к аномерному С1' атому остатка дезоксирибозы в α - или β -конфигурации (dR^{α} и dR^{β}). **Г, Д** – структура моно-пептидных FC 21-FC- α /21-FC-p (**Г**) и 21-FC- β /21-FC-p (**Д**), являющихся побочными продуктами синтеза и представляющих собой смесь двух соединений с одним пептидом, статистически конъюгированным либо к dR, либо к аминоксильному линкеру, связанному с 5'-фосфатной группой dR. dR^{α} и dR^{β} – остатки дезоксирибозы с аминоксильным линкером, присоединенным к аномерному С1' атому в α или β конфигурации.

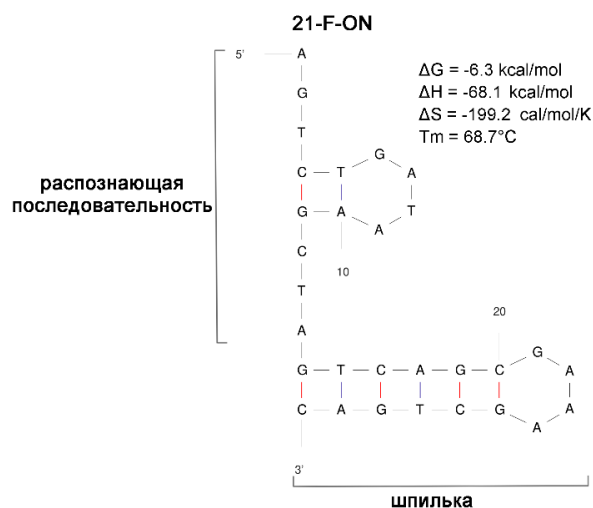


Рисунок 8. Наиболее стабильная структура миРНК-21-направленного шпильчатого олигонуклеотида 21-F-ON, согласно расчетам с использованием сервиса DINAMelt (www.unafold.org).

Для обеспечения каталитической функции в структуру вилокподобных миРНКаз было включено два пептида Acetyl-[LRLRG]₂-COOH, присоединенных к олигонуклеотиду через С-концевые остатки глицина посредством аминоксильных линкеров к 5'-концевому остатку дезоксирибозы: первый – к 5'-фосфатной группе, второй – к аномерному С1' атому этого же остатка сахара (**Рис. 7 А – В**). Для изучения влияния пространственной ориентации каталитических доменов на активность соединений было синтезировано два типа миРНК-21-направленных вилокподобных миРНКаз, отличающихся конфигурацией второго пептида: α -конфигурация (21-FC- α p, **Рис. 7 Б, Таблица 2**) или β -конфигурация (21-FC- β p, **Рис. 7 В, Таблица 2**).

Для оценки каталитической активности вилочной структуры миРНКаз были также использованы моно-пептидные конъюгаты 21-FC- α /21-FC-p и 21-FC- β /21-FC-p (**Рис. 7 Г и Д**), которые являлись побочными продуктами синтеза вилокподобных миРНКаз и представляли собой смесь двух соединений с одним пептидом, в одном из которых пептид был статистически присоединен к 5'-фосфатной группе дезоксирибозы, а во втором – к С1' атому дезоксирибозы.

Таким образом, было разработано и синтезировано 4 серии миРНКаз, нацеленных на различные функциональные области микроРНК-мишени. Двойные и петлеобразующие миРНКазы направлены на центральную и 3'-область дополнительных взаимодействий, крабоподобные конструкции позволяют одновременно воздействовать на затравочную и терминальную области, а вилкоподобные миРНКазы преимущественно направлены на 3'-область дополнительных взаимодействий и терминальную области микроРНК. Предполагается, что выбор области адресации может определять эффективность расщепления и инактивации микроРНК в условиях *in vitro* и *in vivo*. Разработанные миРНКазы имели различные структурные особенности, такие как длина и структура распознающих доменов, модификации нуклеотидов, количество и способ присоединения каталитических пептидов, что позволит в дальнейшем выявить оптимальный дизайн сиквенс-специфической миРНКазы, осуществляющей эффективное подавление микроРНК-мишени.

3.2. Исследование гибридизационных свойств разработанных миРНКаз

Одной из ключевых характеристик, оказывающих существенное влияние на эффективность сиквенс-специфического расщепления миРНКазы, является их способность связываться с РНК-мишенями.

Для всех типов конъюгатов, исследуемых в данной работе, была оценена эффективность комплексообразования с соответствующими микроРНК-мишенями методом задержки в геле в 15 %-ном нативном ПААГ. Для реакций в качестве мишеней использовали синтетические одноцепочечные микроРНК, соответствующие последовательностям зрелых миРНК-21-5р, миРНК-17-5р, миРНК-18а-5р и миРНК-155-5р, представленных в клетках мышей и человека. Реакцию гибридизации проводили при концентрации микроРНК 1 мкМ и концентрации миРНКаз в диапазоне 0.1 – 10 мкМ при 37 °С 45 мин в буфере I, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 200 мМ KCl и 1 мМ EDTA, который имитирует внутриклеточные условия и широко использовался в ранее опубликованных работах [45,46,70,84,85]. Для ряда конъюгатов дополнительно использовали коммерческий буфер II, рекомендованный для *in vitro* реакций с участием РНКазы H и содержащий 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 40 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT.

3.2.1. Исследование гибридизационных свойств двойных миРНКаз

При разработке двойных миРНКаз были проведены предварительные эксперименты по исследованию эффективности гибридизации двойных олигонуклеотидов, состоящих из олигодезоксирибонуклеотидов А и Б, связанных двойным триэтиленгликолевым линкером, имитирующих структуру двойных миРНКаз. Было показано, что двойные олигонуклеотиды проявляли низкую эффективность комплексообразования (**Рис. 9**), достигающую 0 – 85 % в

зависимости от последовательности мишени. В связи с этим, для улучшения гибридационных свойств миРНКаз аденины в последовательностях олигонуклеотидов были заменены на 2-аминоаденины (**Рис. 2 А и В, Таблица 2**).

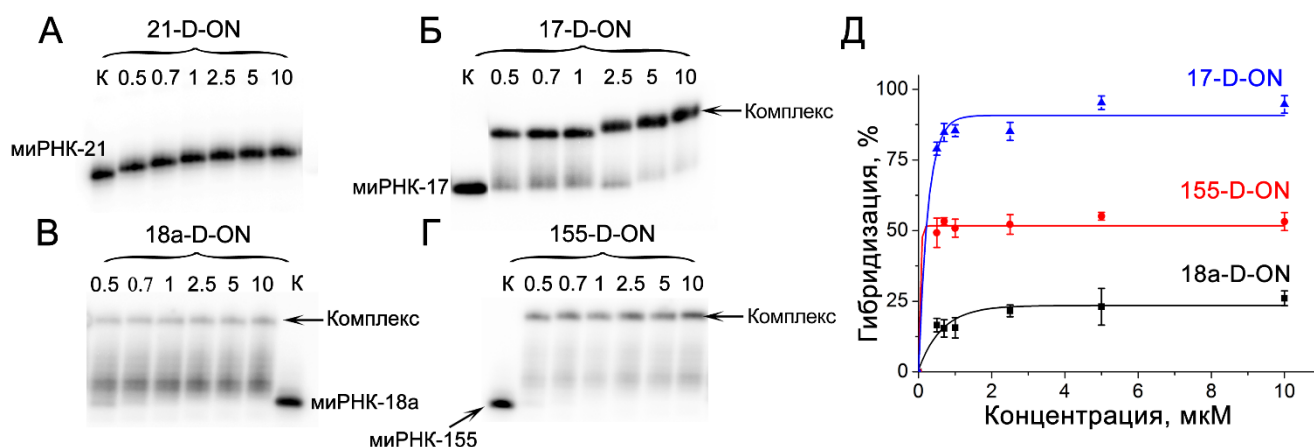


Рис. 9. Гибридация синтетических 5'-[^{32}P]-микроРНК с двойными олигонуклеотидами 21-D-ON, 17-D-ON, 18a-D-ON и 155-D-ON. **А, Б, В, Г** – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующие степень гибридации олигонуклеотидов с миРНК-21, миРНК-17, миРНК-18a и миРНК-155, соответственно. МикроРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с олигонуклеотидами в концентрациях 0.5 – 10 мкМ в буфере I при 37 °С в течение 45 мин. **Д** – концентрационные зависимости связывания двойных олигонуклеотидов с микроРНК. К – контроль, микроРНК инкубировали в отсутствие конъюгатов.

В рамках изучения структурно-функциональных зависимостей был проведен сравнительный анализ гибридационных свойств синтезированных двойных миРНКаз с их одинарными формами (SC от англ. Single Conjugate), которые представляли собой продукты первой стадии синтеза DC и состояли из одного олигонуклеотидного «плеча» А и присоединенного к нему через тиогексильный линкер пептида (**Рис. 10, Таблица 2**). В результате анализа было установлено, что двойные миРНКазы способны значительно более эффективно связывать микроРНК-мишень. При эквимоллярной концентрации соединений по отношению к миРНК-17, миРНК-18a, миРНК-21 и миРНК-155 эффективность комплексообразования достигала 96, 90, 75 и 55%, соответственно, и возрастала до 99, 96, 92 и 69% при 5-кратном избытке DC по отношению к микроРНК-мишени (**Рис. 10**). Для одинарных вариантов эффективность связывания не превышала 60% даже при их 10-кратном избытке (**Рис. 10**). Наиболее низкая эффективность комплексообразования была выявлена для двойной миРНКазы, направленной к миРНК-155 (**Рис. 10 Ж и З**), что может объясняться спонтанным образованием гетеродуплексов миРНК-155 из-за наличия G-богатого участка на 3'-конце микроРНК.

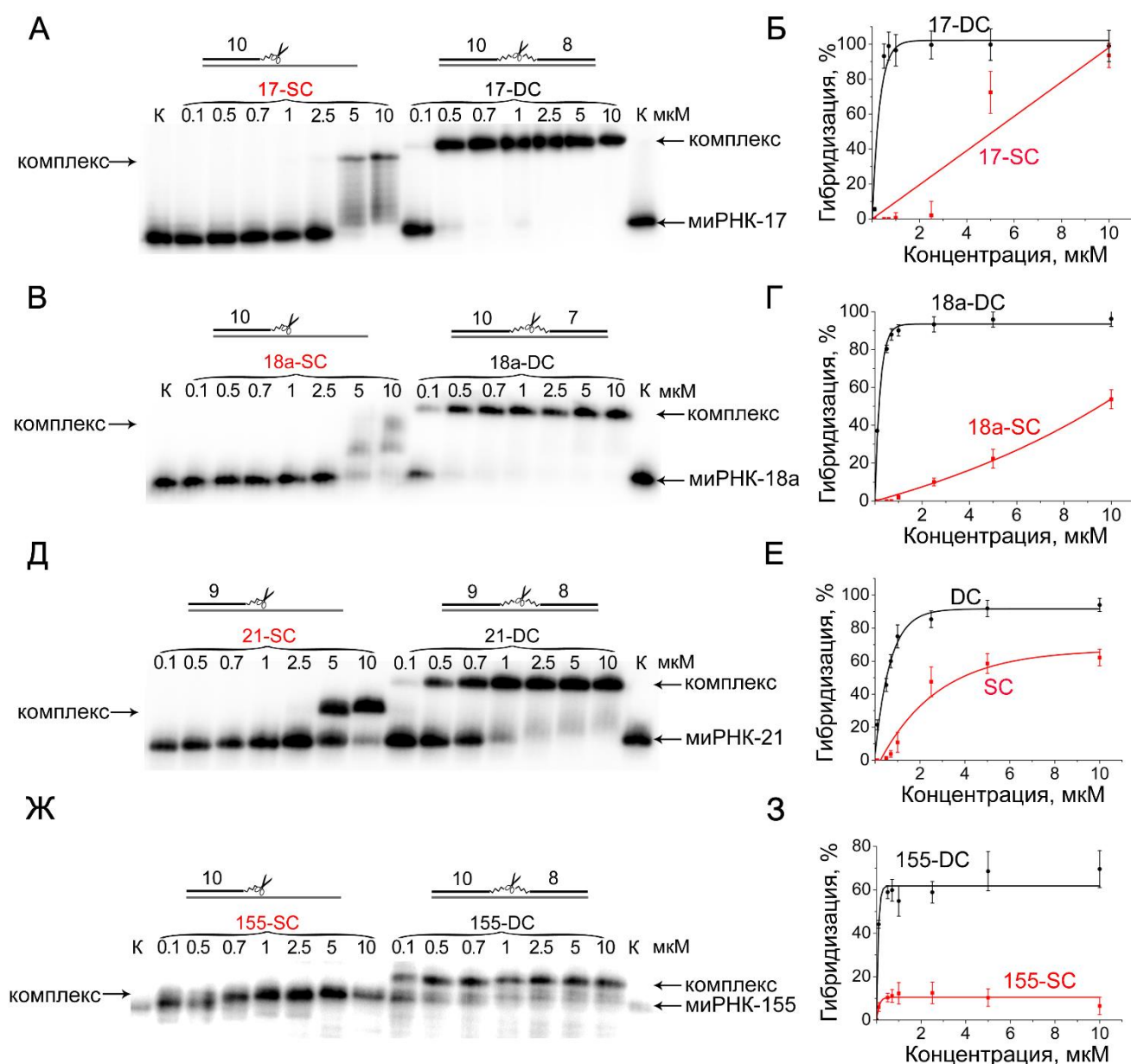


Рис. 10. Гибридизация синтетических 5'-[³²P]-микроРНК с двойными (DC) и одинарными (SC) миРНКазми. **А, В, Д, Ж** – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации миРНКаз с миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-21 и миРНК-155, соответственно. МикроРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с миРНКазми в концентрациях 0.1 – 10 мкМ в буфере I при 37 °С в течение 45 мин. **Б, Г, Е, З** – концентрационные зависимости связывания SC и DC с миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-21 и миРНК-155, соответственно. К – контроль, микроРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. В схематических изображениях комплексов SC и DC с микроРНК (**А, В, Д, Ж**) числа обозначают длину олигонуклеотидного плеча.

3.2.2. Исследование гибридизационных свойств петлеобразующих миРНКаз

Оценку гибридизационной активности петлеобразующих миРНКаз проводили в двух буферных системах. Было показано, что все изучаемые ВС достигали плато эффективности гибридизации уже при эквимольном соотношении по отношению к соответствующей микроРНК в обеих буферных системах. Так, миРНКазы 17-BC-α и 17-BC-β демонстрировали

100%-ную эффективность комплексообразования с миРНК-17 при 1 мкМ концентрации (**Рис. 11 А, В, Г, Е**). Конъюгаты, направленные к миРНК-21, проявляли более низкую степень связывания с мишенью, составляющую 85% (**Рис. 11 Б, В, Д, Е**). Разница в эффективности гибридизации для разных микроРНК может быть обусловлена различиями в нуклеотидном составе РНК, в частности, GC содержанием в области гибридизации – доля GC пар в составе миРНК-21 составляет 35%, а в последовательности миРНК-17 – 50%. Сравнение констант ассоциации (K_a) в двух буферных системах показало, что связывание всех исследуемых ВС с микроРНК в буфере I в 6–10 раз эффективнее, чем в буфере II (**Таблица 5**), что, может быть связано с концентрацией ионов калия в растворе: 0.2 М KCl в буфере I и 0.04 М KCl в буфере II.

Для петлеобразующих миРНКаз, направленных к миРНК-17, ориентация пептида, α или β , не оказывала значительного влияния на эффективность гибридизации с миРНК. Значения константы ассоциации для 17-BC- α и 17-BC- β составили $46.1 \pm 15.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $42.7 \pm 13.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, соответственно (**Таблица 5**). Однако, для ВС, направленных к миРНК-21, наблюдалось различие в эффективности связывания в зависимости от ориентации пептида: K_a для 21-BC- $\alpha 1$ составила $96.0 \pm 30.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, тогда как для 21-BC- $\beta 1$ – лишь $4.9 \pm 1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (**Таблица 5**). Таким образом, α -ориентация пептидного компонента в составе ВС обеспечивает более высокую аффинность к мишени по сравнению с β -конфигурацией.

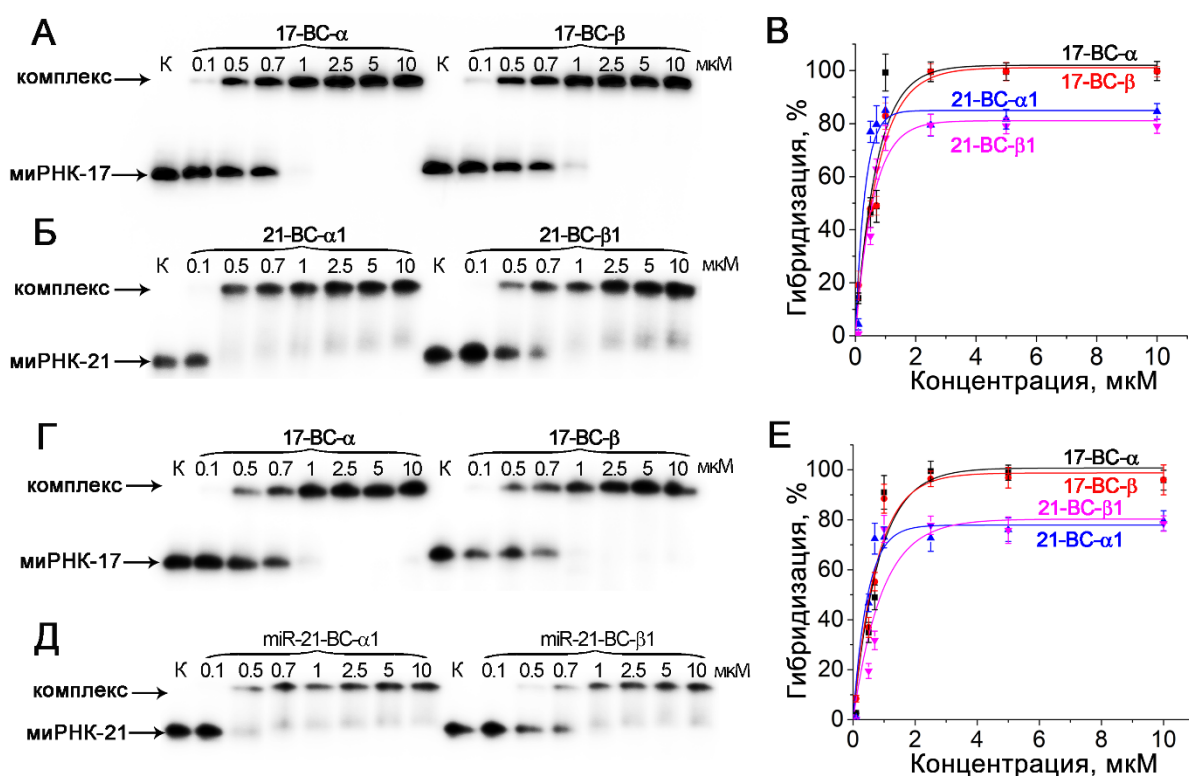


Рис. 11. Гибридизация синтетических 5'-[^{32}P]-меченых миРНК-17 и миРНК-21 с петлеобразующими миРНКазми (ВС) в двух буферных системах. А, Б, Г, Д – радиоавтографы 15%-ного нативного ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации миРНКаз 17-BC- α и 17-BC- β с миРНК-17 (А, Г) и 21-BC- $\alpha 1$ и 21-BC- $\beta 1$ с миРНК-21 (Б, Д) в буфере I (А, Б) и буфере II

(Г, Д). МикроРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с конъюгатами в концентрациях 0.1 – 10 мкМ в буфере I или буфере II при 37°C в течение 45 мин. К – контроль, миРНК-17 и миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. В, Е – концентрационная зависимость связывания конъюгатов с микроРНК-мишенями в буфере I (В) и буфере II (Е).

Таблица 5. Гибридизационные свойства и рибонуклеазная активность разработанных миРНКаз.

миРНКаз	$K_a, \times 10^{-6}, M^{-1}$	$k_{obs}, \times 10^{-6}, c^{-1}$	Сайты расщепления
17-DC		0.18±0.02 ^(1, I) 1.9±0.04 ^(1, II)	U10-A11, C12-A13 ^(1, I) U15-G16, G14-U15, A13-G14, C12-A13, A11-C12, U10-A11, U9-U10 ^(1, II)
18a-DC		0.34±0.02 ^(1, I) 2.2±0.06 ^(1, II)	U12-A13 ^(1, I) U15-G16, G14-U15, A13-G14, U12-A13, C11-U12, U10-C11 ^(1, II)
21-DC	14.45 ±1.26 ^(1, II)	0 ^(1, I) 3.28±0.33 ^(1, II)	U14-G15, C13-U14, A12-C13, G11-A12, A10-G11, C9-A10 ^(1, II)
155-DC		0.85±0.17 ^(1, I) 5.43±1.73 ^(1, II)	U17-A18, G15-A16, U14-G15, G13-U14, U12-G13, U11-U12, U8-A9 ^(1, I) U17-A18, A16-U17, G15-A16, U14G15, C13- U14, U12-G13, U11-U12, U8-A9 ^(1, II)
21-BC-α1	96.0±30.0 ^(1, I) 26.9±8.5 ^(1, II)	0.38±0.03 ^(1, II)	A10-G11, C9-A10, U8-C9 ^(1, II)
21-BC-α2	n.d.	0.28±0.01 ^(1, II)	G11-A12, A10-G11, C9-A10 ^(1, II)
21-BC-β1	4.9±1.7 ^(1, I) 0.8±0.3 ^(1, II)	0.87±0.05 ^(1, II)	G11-A12, A10-G11, C9-A10, U8-C9 ^(1, II)
21-BC-β2	n.d.	0.57±0.03 ^(1, II)	G11-A12, A10-G11, C9-A10, U8-C9 ^(1, II)
17-BC-α	46.1±15.4 ^(1, I) 3.6±1.2 ^(1, II)	1.31±0.08 ^(1, I) 1.48±0.12 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, I) C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
17-BC-β	42.7±13.4 ^(1, I) 4.5±1.4 ^(1, II)	1.13±0.06 ^(1, I) 1.19±0.03 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, I) C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
17-BC-αα	n.d.	4.86±0.27 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
17-BC-ββ	n.d.	13.9±3.26 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
21-CC-αα	0.35±0.05	4.50±0.56 ⁽²⁾ 2.56±0.10 ^(3, I)	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾ C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ^(3, I)
21-CC-ββ	n.d.	6.07±0.29 ⁽²⁾ 4.64±0.12 ^(3, I)	G21-A22, G18-U19, C9-A10, U6-A7, C4- U5, G3-C4, U1-A2 ⁽²⁾ G21-A22, C9-A10, U6-A7, C4-U5, G3-C4, U1-A2 ^(3, I)
21-CC-pp	n.d.	20.08±1.73 ⁽²⁾ 22.34±2.92 ^(3, I)	G21-A22, G18-U19, C9-A10, U6-A7, C4- U5, G3-C4, U1-A2 ⁽²⁾ C9-A10, U6-A7, U5-U6, C4-U5, G3-C4, U1- A2 ^(3, I)

21-CC-5'p	n.d.	0.61±0.05 ⁽²⁾	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾
21-CC-3'p	n.d.	1.91±0.02 ⁽²⁾	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾
21-CC-5'α/21-CC-3'α	n.d.	0.67±0.04 ⁽²⁾	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾
17-CC-αα	0.34±0.09	88.55±4.43 ⁽²⁾ 49.08±7.01 ^(3, I)	U21-A22, C17-A18, C12-A13, U10-A11, U6-G7, C1-A2 ⁽²⁾ U21-A22, C17-A18, C12-A13, U10-A11, U6-G7, C1-A2 ^(3, I)
17-CC-5'α/17-CC-3'α	n.d.	3.17±0.36 ⁽²⁾	U21-A22, C12-A13, U10-A11, U6-G7, C1-A2 ⁽²⁾
21-FC-αp	0.57±0.07	8.5±1.3 ^(1, I) 14.6±3.3 ^(3, I)	U1-A2, U14-G15, U17-G18, U19-U20 ^(1, I) U1-A2, U6-A7, C9-A10, U17-G18 ^(3, I)
21-FC-βp	0.63±0.09	4.6±0.3 ^(1, I) 5.0±0.3 ^(3, I)	U1-A2, U14-G15, G15-A16, U17-G18, G18-U19, U19-U20, G21-A22 ^(1, I) U1-A2, U6-A7, C9-A10 ^(3, I)
21-FC-α/21-FC-p	2.83±0.75	7.9±0.7 ^(1, I)	U1-A2, U14-G15, U17-G18, U19-U20 ^(1, I)
21-FC-β/21-FC-p	1.56±0.21	5.2±0.5 ^(1, I)	U1-A2, U14-G15, U17-G18, U19-U20 ^(1, I)

K_a – константа ассоциации. k_{obs} – наблюдаемая константа скорости. ^(1, I) и ^(1, II) однооборотный режим реакции с 20-кратным избытком миРНКазы по отношению к микроРНК ([микроРНК] = 1 мкМ и [миРНКазы] = 20 мкМ) в буфере I и буфере II, соответственно; ⁽²⁾ однооборотный режим реакции с 5-кратным избытком миРНКазы по отношению к микроРНК ([микроРНК] = 1 мкМ и [миРНКазы] = 5 мкМ) в буфере I; ^(3, I) многооборотный режим реакции ([микроРНК] = 10 мкМ и [миРНКазы] = 5 мкМ) в буфере I. Сайты расщепления обозначены цветами в соответствии с функциональной областью микроРНК: **розовый** – seed область; **голубой** – центральная петля; **оранжевый** – область 3'-дополнительных взаимодействий; **фиолетовый** – 3'-терминальная область.

3.2.3. Исследование гибридизационных свойств крабоподобных миРНКаз

Оценку связывающей способности крабоподобных миРНКаз с идентичными распознающими доменами оценивали для 21-CC-αα, направленного к миРНК-21, и 17-CC-αα, направленного к миРНК-17. Исследования показали, что в эквимольном соотношении исследуемые миРНКазы демонстрировали низкую эффективность связывания. Максимальная эффективность гибридизации достигалась при 5-кратном избытке CC по отношению к микроРНК, когда степень комплексообразования составляла 84% для 21-CC-αα и 89% для 17-CC-αα (**Рис. 12**). Однако даже при увеличении концентрации миРНКаз до 10 мкМ 100%-ное связывание не было достигнуто. Предполагаемой причиной этого ограничения может быть способность миРНК-21 и миРНК-17 формировать в растворе стабильные шпилечные структуры с расчетными температурами плавления 44.8 °C и 54.4 °C, соответственно, а также существовать в виде частично комплементарных гомодуплексов ($T_m=49.7$ °C для миРНК-21 и $T_m=44.4$ °C для

миРНК-17) (**Рис. 13**). Наличие вторичных структур может создавать термодинамические ограничения, препятствующие полному связыванию РНК-мишени с укороченными олигонуклеотидными доменами крабоподобных миРНКаз. Значения констант ассоциации для исследуемых миРНКаз составили $0.35 \pm 0.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для 21-СС- α и $0.34 \pm 0.09 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для 17-СС- α (**Таблица 5**).

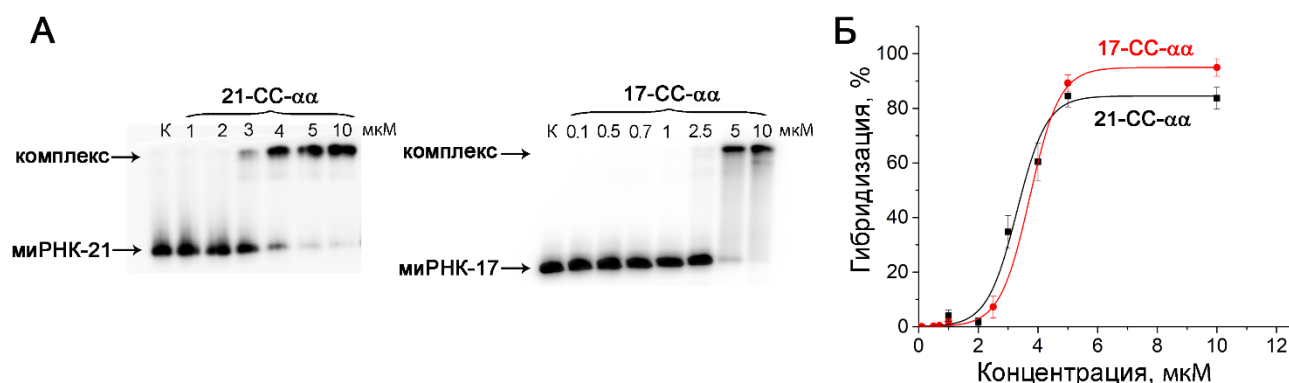


Рис. 12. Гибридизация синтетических 5'-[^{32}P]-меченых миРНК-21 и миРНК-17 с крабоподобными миРНКазами. **А** – радиоавтограф 15%-ного нативного ПААГ, демонстрирующий степень гибридизации миРНКаз 21-СС- α и 17-СС- α с миРНК-21 и миРНК-17. МикроРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с конъюгатами в концентрациях 0.1 – 10 мкМ в буфере I при 37°C в течение 45 мин. К – контроль, миРНК-21 и миРНК-17 инкубировали в отсутствие конъюгатов. **Б** – концентрационная зависимость связывания конъюгатов с микроРНК-мишенями.

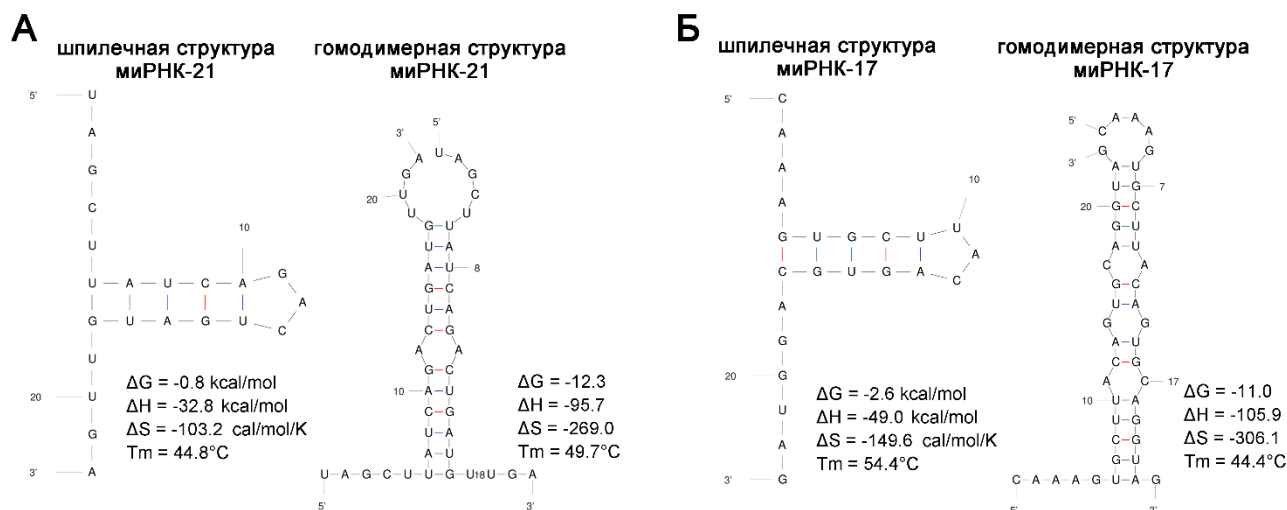


Рис. 13. Наиболее стабильные шпильчатые и гомодимерные структуры миРНК-21 (**А**), миРНК-17 (**Б**) при концентрации 1 мкМ по данным сервиса DINAMelt (www.unafold.org).

3.2.4. Исследование гибридизационных свойств вилкоподобных миРНКаз

Гибридизационные характеристики вилкоподобных миРНКаз 21-FC- β р и 21-FC- α р оценивали в сравнении с их моно-пептидными производными. Анализ показал, что 21-FC- β р и 21-FC- α р способны эффективно связываться с мишенью при 2.5-кратном избытке по отношению к микроРНК, при этом степень гибридизации составляет 65-75% (**Рис. 14 А и В**). При этом моно-

пептидные аналоги 21-FC- α /21-FC-р и 21-FC- β /21-FC-р проявляли более высокую эффективность связывания с микроРНК, что наиболее отчетливо наблюдалось при низких концентрациях (0.1 – 1 мкМ) (**Рис. 14 Б и В**). Константы ассоциации для бис-пептидных вилкоподобных миРНКаз в 2–3 раза ниже по сравнению с соответствующими моно-пептидными аналогами (**Таблица 5**). Таким образом, включение второго каталитического пептида в структуру вилкоподобных миРНКаз приводило к снижению эффективности комплексообразования с мишенью. При этом конфигурация присоединения пептида к олигонуклеотиду (α или β) не оказывала существенного влияния на способность конъюгатов связываться с микроРНК.

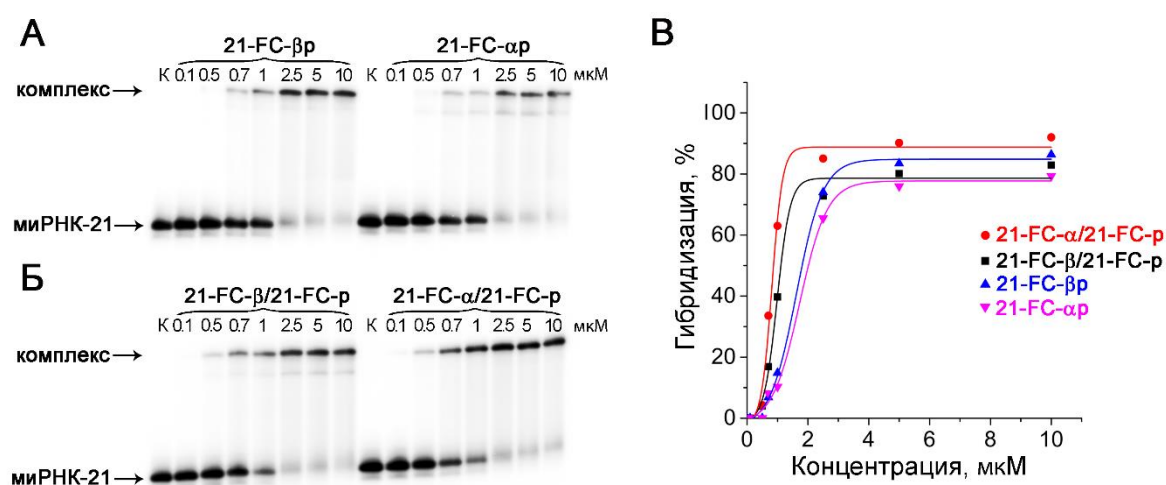


Рис. 14. Гибридизация синтетической 5'-[32 P]-меченой миРНК-21 с вилкоподобными миРНКазами. **А, Б** – радиоавтографы 15%-ного нативного ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации бис-пептидных вилкоподобных миРНКаз 21-FC- β р, 21-FC- α р (**А**) и моно-пептидных аналогов 21-FC- β /21-FC-р, 21-FC- α /21-FC-р (**Б**) с миРНК-21. МикроРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с конъюгатами в концентрациях 0.1 – 10 мкМ в буфере I при 37 °С в течение 45 мин. К – контроль, миРНК-21 инкубировали в отсутствие конъюгатов. **В** – концентрационная зависимость связывания конъюгатов с микроРНК-мишенями.

Таким образом, комплексное исследование гибридизационных свойств разработанных миРНКаз показало, что эффективность комплексообразования зависит как от структурных особенностей соединений, таких как длина олигонуклеотидного домена, наличие модификаций, характер присоединения пептидов, так и последовательности микроРНК-мишени, в частности, GC-состава и её вторичных структур. Также, на примере петлеобразующих миРНКаз показано влияние буферной системы на эффективность связывания. При этом установлено, что все миРНКазы способны образовывать комплексы с микроРНК-мишенями с высокой эффективностью в условиях 5-кратного избытка, которая достигает 75-100% для двойных и петлеобразующих миРНКаз, 75-90% для вилкоподобных и 85% для крабоподобных миРНКаз. При этом выявлено, что максимальная эффективность связывания для двойных и

петлеобразующих конструкций наблюдается уже при эквимольной концентрации миРНКаз с микроРНК, а для вилкоподобных – при 2.5-кратном избытке.

3.3. Исследование каталитической активности и нуклеотидной специфичности разработанных миРНКаз

Комплексное изучение эффективности и специфичности расщепления микроРНК проводили в двух экспериментальных условиях: (1) модель однооборотного каталитического режима, позволяющая оценить продуктивность одного каталитического цикла реакции (с 20-кратным или 5-кратным молярным избытком конъюгата по отношению к микроРНК), что соответствует оптимизированным ранее условиям анализа каталитических характеристик структурно-родственных искусственных рибонуклеаз [45,46,62] и обеспечивает возможность сравнительного анализа с ранее сконструированными соединениями, и (2) многооборотный каталитический режим (с 2-кратным избытком микроРНК), необходимый для оценки способности расщеплять избыток молекул-мишеней, моделируя биологические условия. Реакцию расщепления в условиях однооборотной реакции проводили при концентрации микроРНК 1 мкМ и миРНКаз 5 мкМ или 20 мкМ. Реакцию расщепления в условиях многооборотной реакции проводили при концентрации микроРНК 10 мкМ и миРНКазы 5 мкМ. Реакцию проводили в течение 48-72 ч при 37 °С. Продукты расщепления анализировали методом денатурирующего ПААГ-электрофореза согласно протоколу, приведённому в разделе «Материалы и методы».

3.3.1. Исследование рибонуклеазной активности двойных миРНКаз

Исследование эффективности и специфичности расщепления микроРНК под действием двойных миРНКаз 17-DC, 18a-DC, 21-DC, 155-DC проводили в условиях однооборотной реакции с 20-кратным избытком конъюгата по отношению к микроРНК в двух буферных системах.

Было показано, что состав буферного раствора оказывает существенное влияние на эффективность и специфичность расщепления двойными конъюгатами. Кинетический анализ расщепления миРНК-17, миРНК-18a и миРНК-155 под действием DC показал, что степень расщепления мишеней в буфере I через 48 ч составляет 2%, 7% и 16%, соответственно (**Рис. 15**). Изучение паттернов расщепления микроРНК миРНКазами показало, что в буфере I DC проявляют преимущественно пиримидин-А специфичность. Для миРНК-17 основными сайтами расщепления являются U10-A11 и C12-A13 (**Рис. 15 А**), для миРНК-18a – U12-A13 (**Рис. 15 Б**). Паттерн расщепления миРНК-155 под действием 155-DC был более сложным: наблюдалось слабое расщепление по всем сайтам в одноцепочечном участке РНК-мишени, а основными сайтами расщепления являлись связи U8-A9 и U17-A18, фланкирующие одноцепочечный участок миРНК-155 (**Рис. 15 В**). Такой паттерн расщепления объясняется присутствием низко

стабильных пар оснований А-Т и U-A, способствующих локальной конформационной флуктуации («дыханию») дуплекса DC с микроРНК.

Несмотря на то, что все исследованные DC демонстрировали высокую аффинность к мишеням, двойная миРНКаза, направленная к миРНК-21, не вызывала расщепление целевой последовательности мишени, что, вероятно, обусловлено особенностями нуклеотидного состава миРНК-21 (**Рис. 15 Г**) – отсутствием чувствительных к данному типу конъюгатов пиримидин-А связей в области одноцепочечного участка микроРНК, образуемого при связывании с DC. Для проверки данной гипотезы был проведен анализ расщепления синтетической миРНК-21_1, содержащей 2 замены в области одноцепочечного участка микроРНК (AGACU → AUACA) с целью получения более чувствительных к расщеплению С-А и U-A связей. Было выявлено, что замены, действительно, обеспечивают эффективное расщепление миРНК-21_1 миРНКазой 21-DC по сайтам U11-A12 и C13-A14, а степень расщепления достигала 18% (**Рис. 15 Д и Е**).

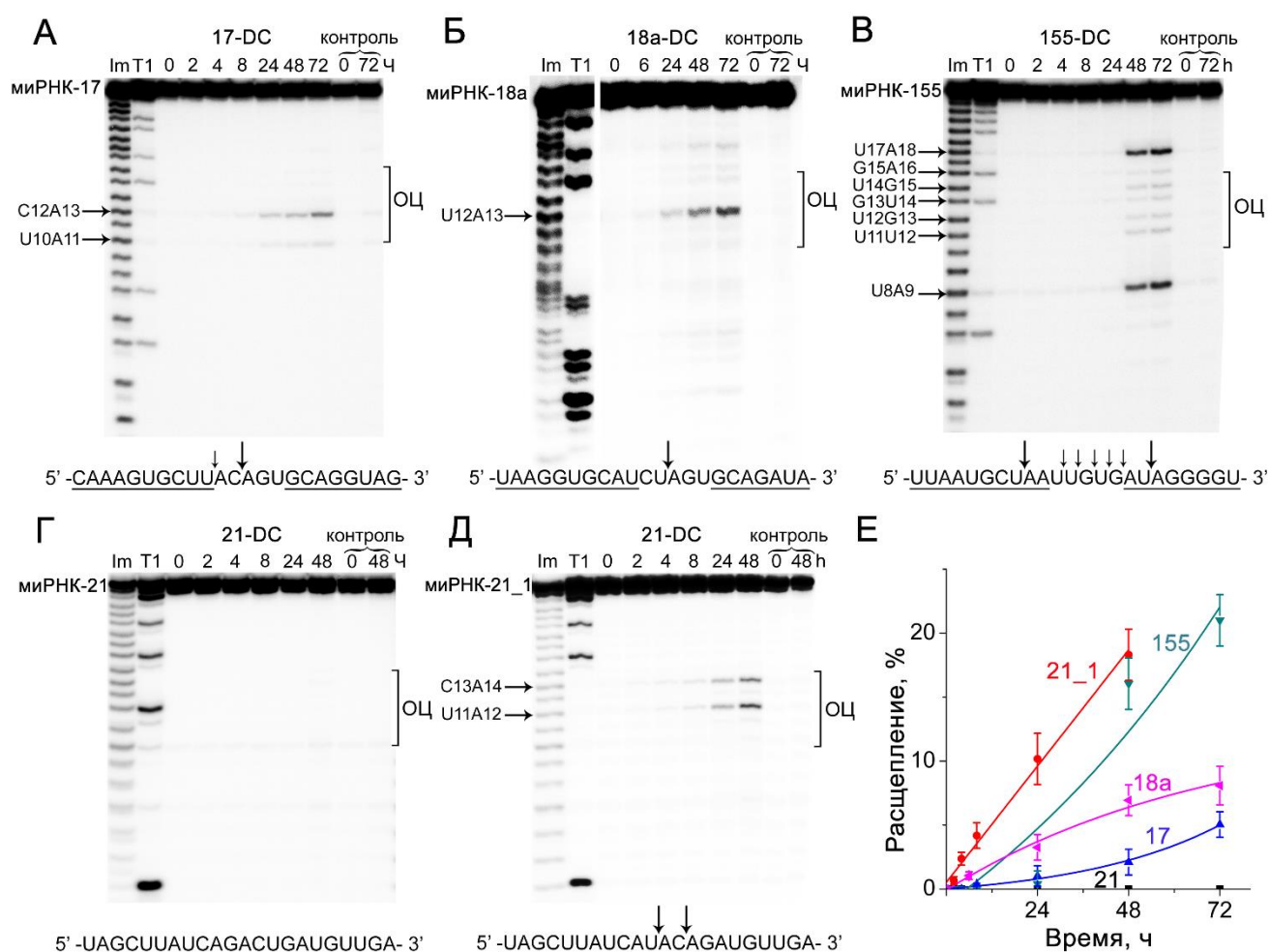


Рис. 15. Кинетика расщепления синтетических 5'-[³²P]-меченых миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1 двойными миРНКазами в буфере I. **А, Б, В, Г, Д** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1, соответственно. микроРНК (1 мкМ) и миРНКазу (20 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-микроРНК инкубировали

в отсутствие конъюгатов. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с конъюгатами (в часах). ОЦ – одноцепочечный участок, образующийся при связывании ДС с микроРНК-мишенью. Е – кинетические зависимости расщепления микроРНК под действием двойных миРНКаз.

При проведении реакции расщепления микроРНК двойными миРНКазами в буфере II наблюдалось изменение профиля расщепления, а также увеличение рибонуклеазной активности соединений. Эффективность расщепления для миРНК-17 возросла с 2% до 32%, для миРНК-18а – с 7% до 23%, а для миРНК-155 – с 16% до 57% (Рис. 16 А – В). В этих условиях эффективность расщепления мишени под действием 21-ДС увеличилась с 0% до 30% для миРНК-21 и с 18% до 63% для миРНК-21_1 (Рис. 16 Г – Е). Наблюдаемая константа скорости расщепления РНК (k_{obs}) двойными миРНКазами в буфере II увеличивалась в 10, 7, 6 и 3 раза по сравнению с k_{obs} в буфере I для миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155 и миРНК-21_1, соответственно (Таблица 5). Изучение профиля расщепления микроРНК показало, что двойные миРНКазы расщепляли мишень практически по всем сайтам в одноцепочечном участке микроРНК, образуя при связывании с ДС, с преобладанием расщепления по U-A и C-A связям.

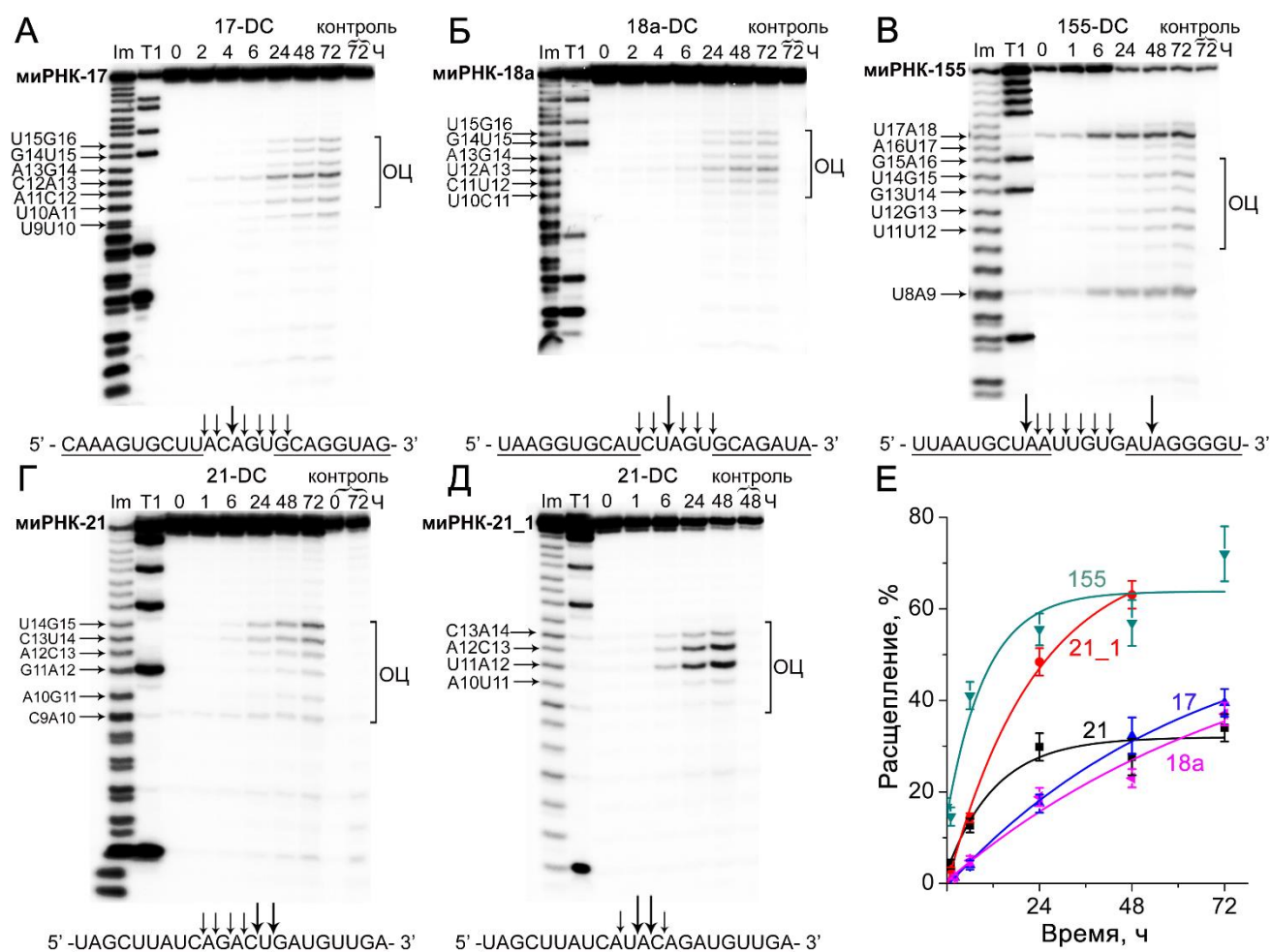


Рис. 16. Кинетика расщепления синтетических 5'-[32 P]-меченых миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1 двойными миРНКазами в буфере II. А, Б, В, Г, Д – радиоавтографы

18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1, соответственно. микроРНК (1 мкМ) и конъюгат (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-микроРНК инкубировали в отсутствие конъюгатов. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с конъюгатами (в часах). ОЦ – одноцепочечный участок, образующийся при связывании ДС с микроРНК-мишенью. Е – кинетические зависимости расщепления микроРНК под действием двойных миРНКаз.

Для определения диапазона условий, в которых миРНКазы способны эффективно и специфично катализировать расщепление микроРНК, представляло интерес исследование рибонуклеазной активности соединений в буферных системах с различными значениями pH.

Для исследования влияния pH на каталитическую активность двойных миРНКаз была проведена серия экспериментов по расщеплению миРНК-17 и миРНК-18а соответствующими ДС в буферных растворах с перекрывающимися значениями pH: натрий-ацетатном буфере (SA) с pH 3.7–5.0, 2-(N-морфолино)этансульфонатном буфере (MES) с pH 4.5–6.0, с с pH 6.0–9.5 и Трис-HCl буфере с pH 7.0–9.0 (подробнее см. раздел «**Материалы и методы**»). МиРНК-17 и миРНК-18а в концентрации 1 мкМ инкубировали с 10-кратным избытком 17-ДС (10 мкМ) и 20-кратным избытком 18а-ДС (20 мкМ), соответственно. В контрольных экспериментах микроРНК инкубировали в тех же буферах и условиях, но без добавления конъюгатов (**Рис. 17**).

Было показано, что pH-зависимые профили расщепления микроРНК двойными миРНКазами можно чётко разделить на три области (**Рис. 18**). В кислой среде (pH 3.7–5.0) наблюдалось неспецифическое расщепление по всей длине молекулы микроРНК, что, вероятно, связано с дестабилизацией дуплекса микроРНК/ДС в условиях низкого pH (**Рис. 18 А**). Этот эффект наиболее отчетливо виден на примере 17-ДС при молярном соотношении микроРНК/ДС = 1/10, тогда как при исследовании 18а-ДС, проводимом при соотношении 1/20, миРНК-18а уже практически полностью деградировала в этих условиях. При этом основными сайтами расщепления были преимущественно пурин-N связи (G-N и A-N). В диапазоне pH 3.7–6.0 наблюдался постепенный переход специфичности расщепления от пурин-N к пиримидин-N (C-N и U-N). При слабокислых, нейтральных и слабощелочных значениях pH (5.5 – 8.0) преобладало специфическое расщепление в одноцепочечной области миРНК, достигая максимума при pH 7.0 для 17-ДС (сайты U10-A11 и C12-A13) и pH 5.5 для 18а-ДС (сайты U12-A13, A13-G14 и G14-U15) (**Рис. 18**). В щелочной среде (pH 8.0–9.5) наблюдался неспецифический щелочной гидролиз микроРНК. В этих условиях расщепление происходило по всей длине молекулы, что соответствовало профилю деградации в контрольных условиях в отсутствие ДС (**Рис. 17, Рис. 18**).



Рис. 17. Самопроизвольный гидролиз 5'-[32 P]-меченой миРНК-17 при различных pH. Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующий продукты расщепления миРНК-17. миРНК-17 в концентрации 1 мкМ инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Над дорожками обозначены значения pH буферного раствора. SA – натрий-ацетатный буфер; MES – 2-(N-морфолино)этансульфонатный буфер; BTP – бис-трис-пропановый буфер; Tris – Трис-НСl буфер.

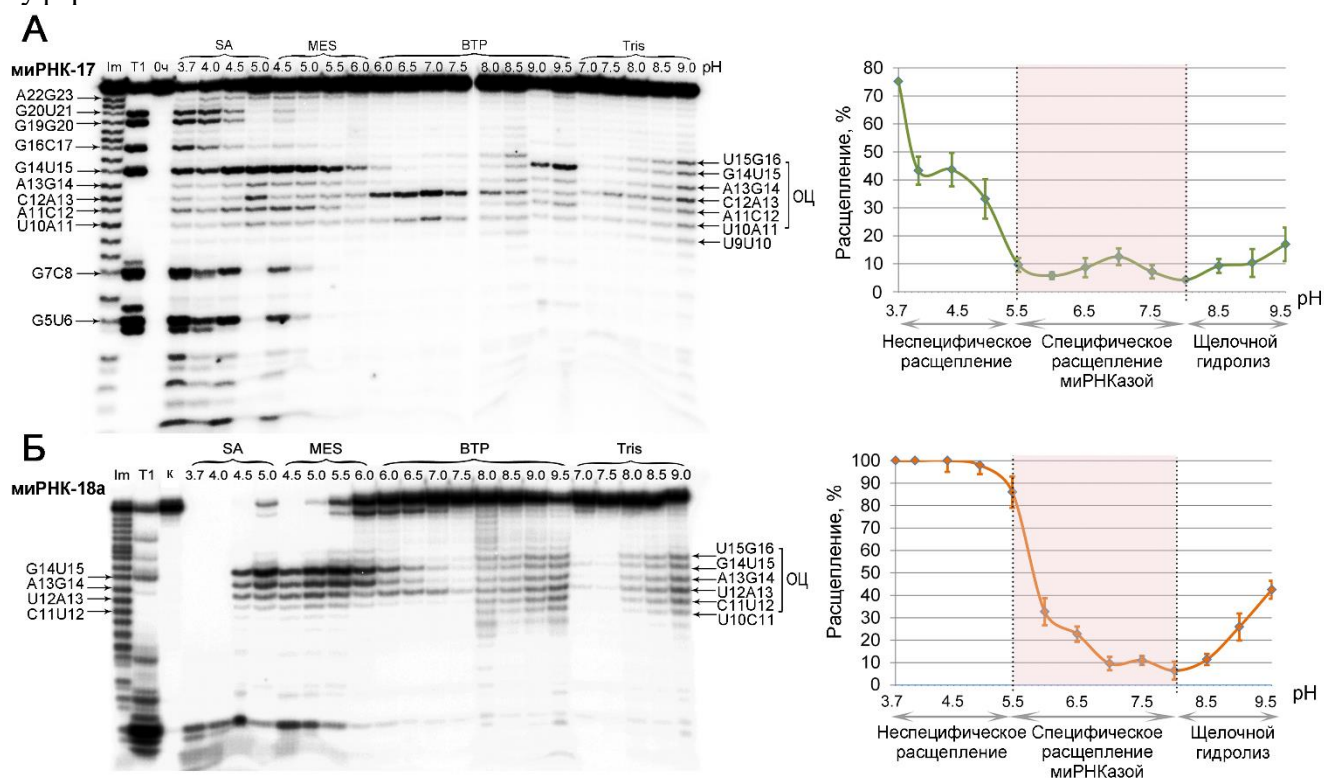


Рис. 18. pH-зависимые профили расщепления синтетических 5'-[32 P]-меченых миРНК-17 и миРНК-18а двойными миРНКазами. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 (**А**) и миРНК-18а (**Б**). миРНК-17 (1 мкМ) и 17-DC (10 мкМ) или миРНК-18а (1 мкМ) и 18а-DC (20 мкМ) инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. К – 5'-[32 P]-

микроРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.0), 100 мМ KCl, 1 мМ DTT. Над дорожками обозначены значения рН буферного раствора. Розовая область на диаграммах обозначает диапазон рН, при котором наблюдалось специфическое расщепление микроРНК под действием DC. ОЦ – однопочечный участок, образующийся при связывании DC с микроРНК-мишенью. SA – натрий-ацетатный буфер; MES – 2-(N-морфолино)этансульфонатный буфер; BTP – бис-трис-пропановый буфер; Tris – Трис-НСl буфер.

Таким образом, анализ влияния рН на рибонуклеазную активность двойных миРНКаз показал, что эффективное и сиквенс-специфическое расщепление микроРНК двойными миРНКазами происходит при субкислых и нейтральных значениях рН. Известно, что внеклеточная среда злокачественных новообразований, особенно в гипоксических и аноксических областях опухолевых тканей, характеризуется субкислыми значениями рН в диапазоне от 5.4 до 6.8 в зависимости от типа опухоли, тогда как в нормальных тканях рН составляет 7.0–7.6 [86,87]. Это обусловлено высоким уровнем образования молочной кислоты и активностью Na^+/K^+ -АТФаз и протонных насосов [88]. Анализ рН-профиля показывает, что DC способны селективно разрушать микроРНК в кислой среде опухоли с минимальным воздействием на нормальные ткани.

3.3.2. Исследование рибонуклеазной активности петлеобразующих миРНКаз

Расщепление конкретных сайтов в последовательности РНК-мишени под действием миРНКаз может быть достигнуто путем «выпетливания» в сахарофосфатном остове цепи РНК неспаренных остатков, расположенных напротив каталитического пептида. Предлагаемый подход позволяет, во-первых, ограничить действие каталитического пептида исключительно интересующими фосфодиэфирными связями в последовательности мишени, а, во-вторых, за счет молекулярного напряжения в структуре значительно повысить их реакционную способность, способствуя расщеплению. При конструировании микроРНК-направленных петлеобразующих рибонуклеаз на первом этапе исследования была проведена оценка способности к спонтанному расщеплению фосфодиэфирных связей в области тринуклеотидного выпетливания вследствие внутримолекулярного напряжения, индуцируемого в результате гибридизации с петлеобразующим олигонуклеотидом, неконъюгированным с пептидом (**Рис. 19**). В этих экспериментах 5'-[^{32}P]-микроРНК инкубировали с адресующими олигонуклеотидами В-ОН в буфере I и буфере II в течение 72 ч. Было показано, что в буфере I миРНК-21 и миРНК-17 при формировании комплексов с комплементарными олигонуклеотидами 21-В-ОН и 17-В-ОН оставались интактными в течение всего периода инкубации. Однако, в результате гибридизации микроРНК с этими же олигонуклеотидами в буфере II происходила дестабилизация фосфодиэфирных связей в петле, что приводило к их медленному расщеплению, которое составляло 6% для миРНК-21 и 11% для миРНК-17 через 72 ч инкубации (**Рис. 19**). Наблюдаемое

расщепление, вероятно, катализируется ионами Mg^{2+} , содержащимися в буферном растворе II. Известно, что в области петли формируется координационный центр, способствующий связыванию ионов металлов, катализирующих расщепление РНК [89]. Таким образом, увеличение реакционной способности фосфодиэфирных связей в последовательности микроРНК путем «выпетливания» может значительно повысить эффективность её расщепления в центральной области под действием петлеобразующих миРНКаз. С учетом этих данных нами были сконструированы петлеобразующие миРНКазы, несущие один или два пептида, ориентированных в α - или β -положении, напротив тринуклеотидной петли в последовательности микроРНК.

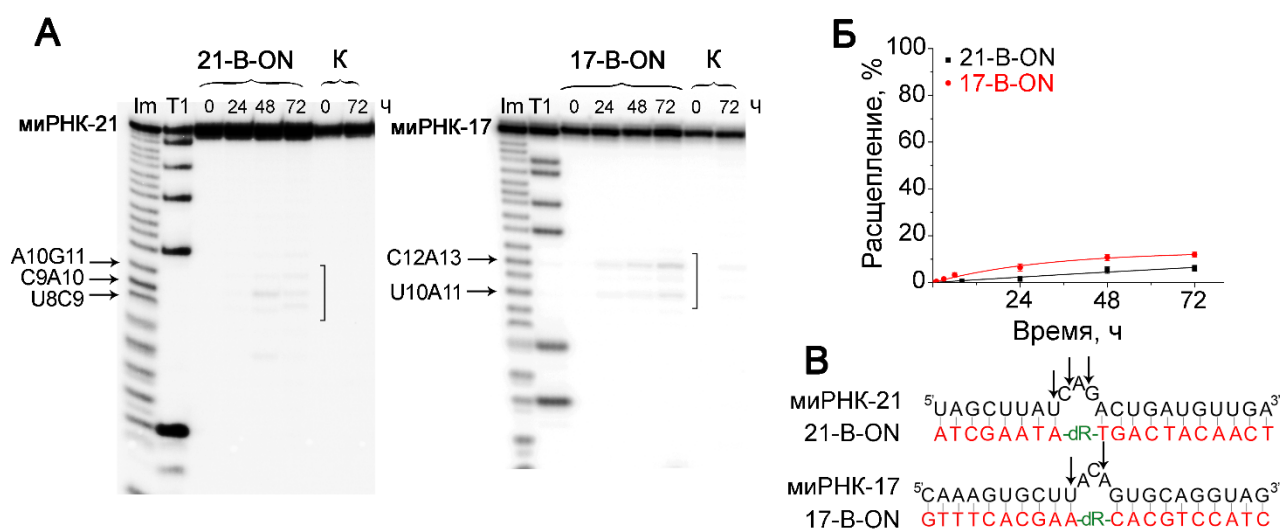


Рис. 19. Расщепление синтетических 5'- $[^{32}P]$ -меченых миРНК-21 и миРНК-17 в комплексе с петлеобразующими олигонуклеотидами 21-B-ON и 17-B-ON в присутствии ионов Mg^{2+} (буфер II). **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 и миРНК-17. микроРНК (1 мкМ) и олигонуклеотиды (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. К – контроль, 5'- $[^{32}P]$ -микроРНК инкубировали в отсутствие олигонуклеотида. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК в комплексе с олигонуклеотидом (в часах). Квадратной скобкой обозначена область выпетливания РНК. **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК-21 и миРНК-17 в комплексе с петлеобразующими олигонуклеотидами. **В** – сайты расщепления миРНК-21 и миРНК-17 в комплексе с петлеобразующими олигонуклеотидами (показаны стрелками).

Рибонуклеазную активность разработанных петлеобразующих миРНКаз, адресованных к миРНК-21 и миРНК-17, исследовали в условиях однооборотной реакции при 20-кратном рибонуклеаз относительно РНК-мишени в двух буферных системах I и II.

Анализ рибонуклеазной активности моно-пептидных петлеобразующих миРНКаз, направленных к миРНК-17, показал, что 17-BC- α и 17-BC- β эффективно расщепляют мишень в области петли, способствуя 25–30 %-ной деградации микроРНК через 72 ч (Таблица 5, Рис. 20 А и Б). При этом состав буфера не оказывал влияния на каталитическую активность исследуемых миРНКаз: степень расщепления и наблюдаемые константы скорости реакции в буферах I и II не

показали статистически значимых различий. Полученные данные свидетельствуют о том, что расщепление миРНК-17 осуществляется в основном за счет каталитической активности пептида и не зависит от присутствия ионов магния. Также было показано, что α - или β - ориентация пептида не оказывает значимого влияния на эффективность расщепления миРНК-17 (Таблица 5, Рис. 20 А и Б). Анализ паттерна расщепления показал, что ВС, направленный к миРНК-17 катализирует гидролиз по всем сайтам в области тринуклеотидной петли A11-C12-A13, с преобладанием C12-A13 и U10-A11 связей. Эффективность деградации возрастала в следующем порядке: C12-A13 > U10-A11 >> A11-C12 (Рис. 20 А и В).

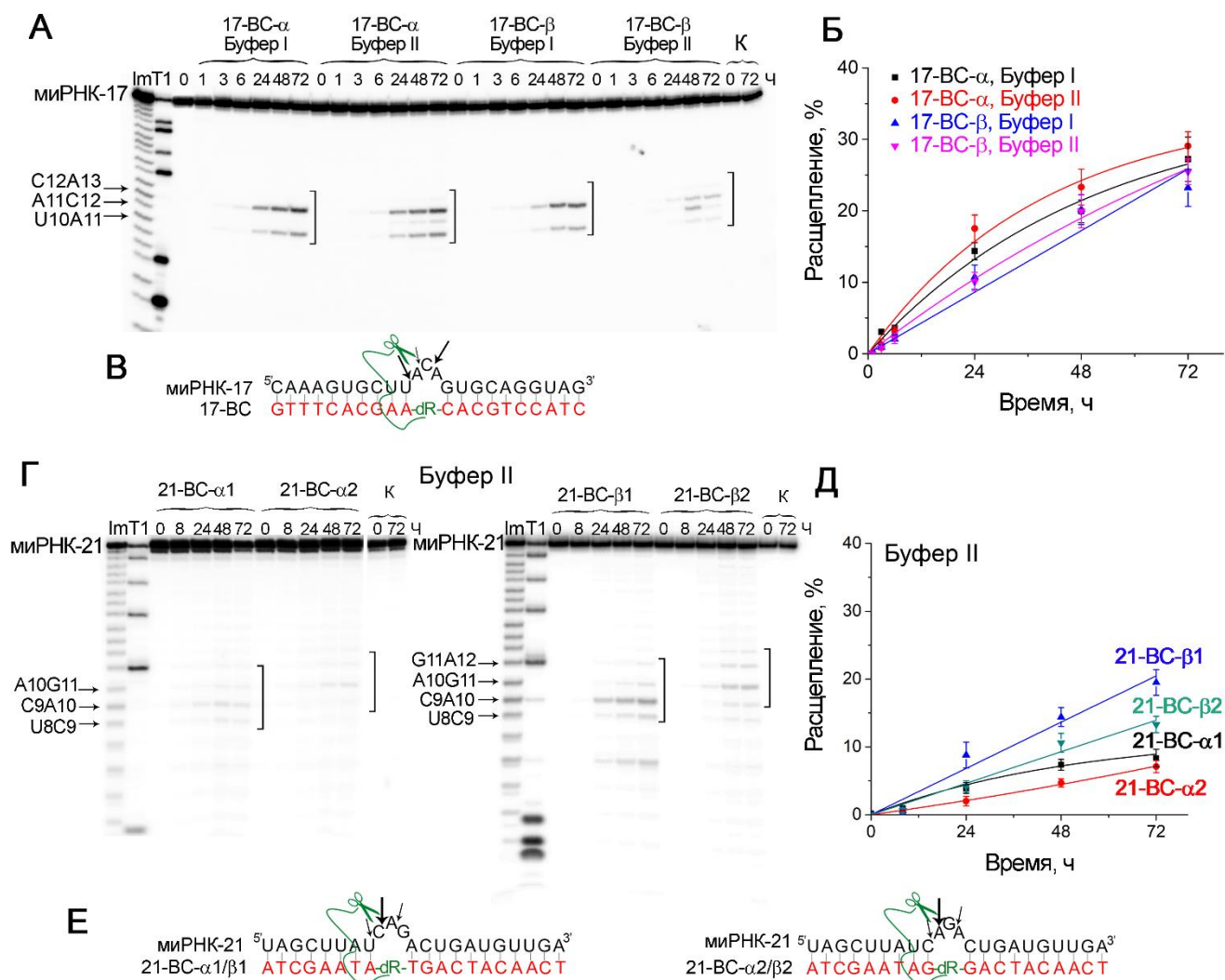


Рис. 20. Расщепление 5'-[32 P]-миРНК-17 и 5'-[32 P]-миРНК-21 моно-пептидными петлеобразующими миРНКазами 17-BC- α , 17-BC- β , 21-BC- α 1, 21-BC- α 2, 21-BC- β 1 и 21-BC- β 2. А, Г – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 в буфере I и II (А) и миРНК-21 в буфере II (Г). микроРНК (1 мкМ) и миРНКазы (20 мкМ) инкубировали при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. К – контроль, 5'-[32 P]-микроРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с миРНКазами (в часах). Квадратной скобкой обозначена область выпетливания РНК. Б, Д – кинетические зависимости расщепления миРНК-17 и миРНК-21 под действием петлеобразующих миРНКаз. В, Е – сайты

расщепления миРНК-17 под действием 17-ВС- α/β и миРНК-21 под действием 21-ВС- $\alpha1/\beta1$ и 21-ВС- $\alpha2/\beta2$. Размер стрелок соответствует степени расщепления микроРНК в конкретных сайтах.

Исследование рибонуклеазной активности миРНК-21-направленных моно-пептидных петлеобразующих миРНКаз показало, что 21-ВС- $\alpha1$, 21-ВС- $\beta1$, 21-ВС- $\alpha2$ и 21-ВС- $\beta2$ не способны катализировать расщепление микроРНК в буфере I, тогда как в буфере II рибонуклеазная активность ВС значительно возрастала (**Рис. 20 Г и Д**). При этом было выявлено, что конфигурация присоединения пептида (α или β) может оказывать влияние на активность соединений. ВС с пептидом в β -положении 21-ВС- $\beta1$ и 21-ВС- $\beta2$ расщепляли миРНК-21 с эффективностью 19% и 13%, соответственно, через 72 ч инкубации. Степень расщепления миРНК-21 под действием петлеобразующих миРНКаз с пептидом, присоединённым в α -положении 21-ВС- $\alpha1$ и 21-ВС- $\alpha2$ была приблизительно вдвое ниже и составляла 7-8%, что лишь незначительно превышало гидролиз микроРНК в комплексе с неконъюгированным олигонуклеотидом 21-В-ОН (**Рис. 19 Б, Рис. 20 Д**). Значения k_{obs} для 21-ВС- $\beta1$ и 21-ВС- $\beta2$ более чем в два раза превышали значения для α -изомеров 21-ВС- $\alpha1$ и 21-ВС- $\alpha2$ (**Таблица 5**). Анализ паттерна расщепления миРНК-21 петлеобразующими миРНКазами показал, что все три фосфодиэфирные связи в тринуклеотидной петле подвергаются разрушению, однако интенсивность расщепления по отдельным связям различались для пар 21-ВС- $\alpha1/\beta1$ и 21-ВС- $\alpha2/\beta2$ вследствие смещения одноцепочечной области (**Рис. 20 Г и Е**). Эффективность соединений 21-ВС- $\alpha1/\beta1$, расщепляющих микроРНК преимущественно по связи C9-A10, была выше, чем у 21-ВС- $\alpha2/\beta2$, для которых основным сайтом расщепления являлся A10-G11. Данное различие обусловлено повышенной восприимчивостью C-A связи к гидролизу как природными, так и искусственными рибонуклеазами, а также склонностью к спонтанному расщеплению, как было показано ранее [89].

Исследование каталитических свойств бис-пептидных петлеобразующих миРНКаз проводили в буфере II, в условиях которого, как было показано ранее, достигается наиболее выраженная деградация микроРНК под действием этого типа конъюгатов. Сравнительный анализ показал, что рибонуклеазная активность бис-пептидных миРНКаз 17-ВС- $\alpha\alpha$ и 17-ВС- $\beta\beta$ значительно превосходит активность моно-пептидных аналогов 17-ВС- α и 17-ВС- β (**Рис. 21**). Присоединение второго пептида в α -ориентации в составе конъюгата 17-ВС- $\alpha\alpha$ увеличивало расщепление миРНК-17 в 2 раза – с 29% до 57% за 72 ч (**Рис. 21 Б**). Тогда как введение второго пептида в β -ориентации в структуре 17-ВС- $\beta\beta$ обеспечивало четырехкратное усиление активности, когда степень деградации достигала 90% за 48 ч и 100% за 72 ч (**Рис. 21 Б**). Полученные результаты, свидетельствуют о том, что β -конфигурация, вероятно, способствует стратегически более выгодному расположению пептида относительно сахарофосфатного остова РНК для эффективного расщепления мишени. Наблюдаемые константы скорости расщепления

микроРНК k_{obs} миРНКазами 17-BC- $\alpha\alpha$ и 17-BC- $\beta\beta$ в 2 и 3 раза превышали значения для моно-пептидных вариантов BC (Таблица 5). Полученные результаты согласуются с ранее проведёнными исследованиями по расщеплению тРНК^{Фен}, в которых петлеобразующие $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -рибонуклеазы обеспечивали 90%-ное расщепление РНК в области петли за 48 ч инкубации [74]. Анализ паттерна расщепления мишени бис-пептидными конъюгатами показал, что аналогично моно-пептидным рибонуклеазам первичными сайтами расщепления миРНК-17 под действием 17-BC- $\alpha\alpha$ и 17-BC- $\beta\beta$ являются связи C12-A13 и U10-A11 (Рис. 21 А и В).

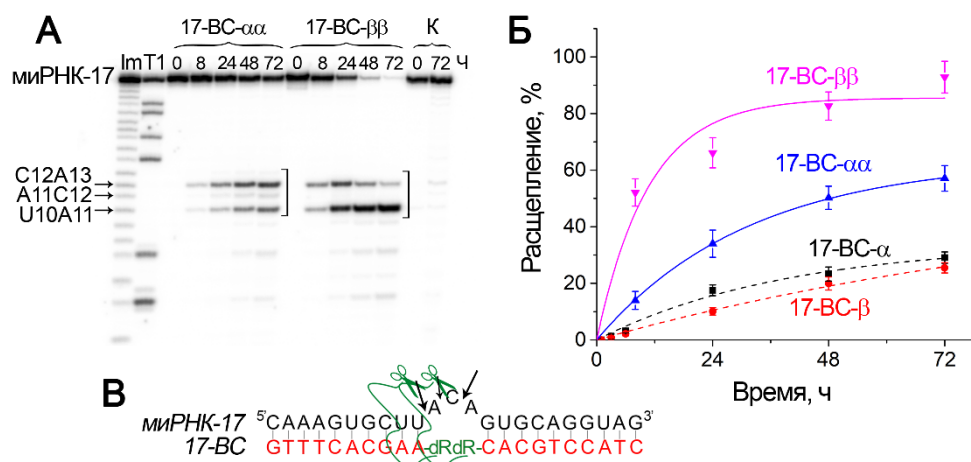


Рис. 21. Расщепление 5'-[³²P]-меченой миРНК-17 бис-пептидными петлеобразующими миРНКазами 17-BC- $\alpha\alpha$ и 17-BC- $\beta\beta$. **А** – радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующего продукты расщепления миРНК-17. микроРНК (1 мкМ) и миРНКазы (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °C в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-миРНК-17 инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с миРНКазой (в часах). Квадратной скобкой выделена область выпетливания РНК. **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК-17 под действием бис-пептидных петлеобразующих миРНКаз. Для сравнения приведены пунктирные кривые, демонстрирующие кинетику расщепления миРНК-17 моно-пептидными аналогами 17-BC- α and 17-BC- β . **В** – сайты расщепления миРНК-17 бис-пептидными петлеобразующими миРНКазами (показаны стрелками).

3.3.3. Исследование рибонуклеазной активности крабоподобных миРНКаз

Изучение рибонуклеазных свойств различных структурных вариантов крабоподобных миРНКаз проводили в буфере I в режиме однооборотного катализа при 5-кратном избытке миРНКаз (5 мкМ) по отношению к микроРНК (1 мкМ) – условиях, при которых достигалось максимальное связывание СС с миРНК-мишенью (Рис. 12).

Анализ рибонуклеазной активности показал, что среди исследованных структурных вариантов миРНК-21-направленных бис-пептидных крабоподобных миРНКаз 21-СС-pp, 21-СС- $\alpha\alpha$ и 21-СС- $\beta\beta$ наибольшую каталитическую активность продемонстрировал 21-СС-pp, в котором два пептида присоединены через 5'-аминогексильный и 3'-6-амино-2-(гидроксиметил)гексильный линкеры к 5'- и 3'-терминальным фосфатным группам адресующего

олигонуклеотида (**Рис. 22 А и В**). Кинетический анализ показал, что через 24 ч инкубации степень расщепления миРНК-21 составляла 84% для 21-СС-pp, 64% для 21-СС-ββ и 32% для 21-СС-αα. К 48 ч степень расщепления под действием 21-СС-pp достигала 94%, а время полурасщепления РНК составило 9.6 ± 0.5 ч, что в 3-5 раз меньше, чем для 21-СС-ββ ($\tau_{1/2} = 31.9 \pm 1.6$ ч) и 21-СС-αα ($\tau_{1/2} = 44.1 \pm 5.3$ ч) (**Рис. 22 А и В**). Предполагается, что высокая рибонуклеазная активность 21-СС-pp обусловлена конформационной подвижностью каталитических пептидов, присоединённых к фосфатным группам адресующего олигонуклеотида через аминоксильные линкеры, тогда как присоединение пептидов к остаткам дезоксирибозы в α- или β-ориентации, вероятно, ограничивает их подвижность.

Дальнейший анализ показал, что бис-пептидные карбоподобные миРНКазы значительно превосходят по каталитической активности моно-пептидные аналоги (**Рис. 22 А и В**). Через 24 ч инкубации степень расщепления миРНК-21 под действием моно-пептидных рибонуклеаз 21-СС-3'p и 21-СС-5'p достигала лишь 15% и 7%, соответственно, в сравнении с 84% для 21-СС-pp. Таким образом, каталитическая активность 21-СС-pp возрастала в 5.6 и 12 раз по сравнению с моно-пептидными аналогами (**Рис. 22 В**). Сходная корреляция наблюдалась для 21-СС-αα и образца 21-СС-5'α/21-СС-3'α, который является побочным продуктом синтеза 21-СС-αα и содержит смесь рибонуклеаз с одним пептидом, статистически равновероятно присоединённым либо к 3'-, либо к 5'-концу распознающего домена (**Рис. 5 Ж, Таблица 2**). Данная неразделенная смесь моно-пептидных миРНКаз в этих же экспериментальных условиях демонстрировала низкую активность, с эффективностью расщепления миРНК-мишени, не превышающей 6%, что в 5.3 раза ниже по сравнению с соответствующей бис-пептидной миРНКазой 21-СС-αα (**Рис 22 В, Таблица 5**). Как видно из представленных данных, удаление одного пептида на 5'- или 3'-конце миРНКазы приводило к резкому снижению скорости деградации РНК: время полурасщепления миРНК-21 увеличивалось в 10 раз для 21-СС-3'p ($\tau_{1/2} = 100.6 \pm 0.6$ ч) и в 33 раза для 21-СС-5'p ($\tau_{1/2} = 317.0 \pm 13.6$ ч) (**Рис. 22 А и В**). Таким образом, введение двух пептидов обеспечивает синергическое усиление каталитической активности.

Аналогичные закономерности были выявлены для крабоподобных миРНКаз, направленных к миРНК-17. Бис-пептидная миРНКаз 17-СС-αα проявляла высокую каталитическую активность, приводя к 98%-ному расщеплению миРНК-17 уже через 24 ч инкубации (**Рис. 22 Б и Г**). В то время как смесь моно-пептидных соединений 17-СС-5'α/17-СС-3'α обеспечивала лишь 32%-ное расщепление мишени. Время полурасщепления миРНК-17 увеличивалось в 30 раз: с 2.2 ± 0.1 ч для 17-СС-αα до 61.2 ± 3.9 ч для смеси моно-пептидных аналогов 17-СС-5'α/17-СС-3'α (**Рис. 22 Б и Г**).

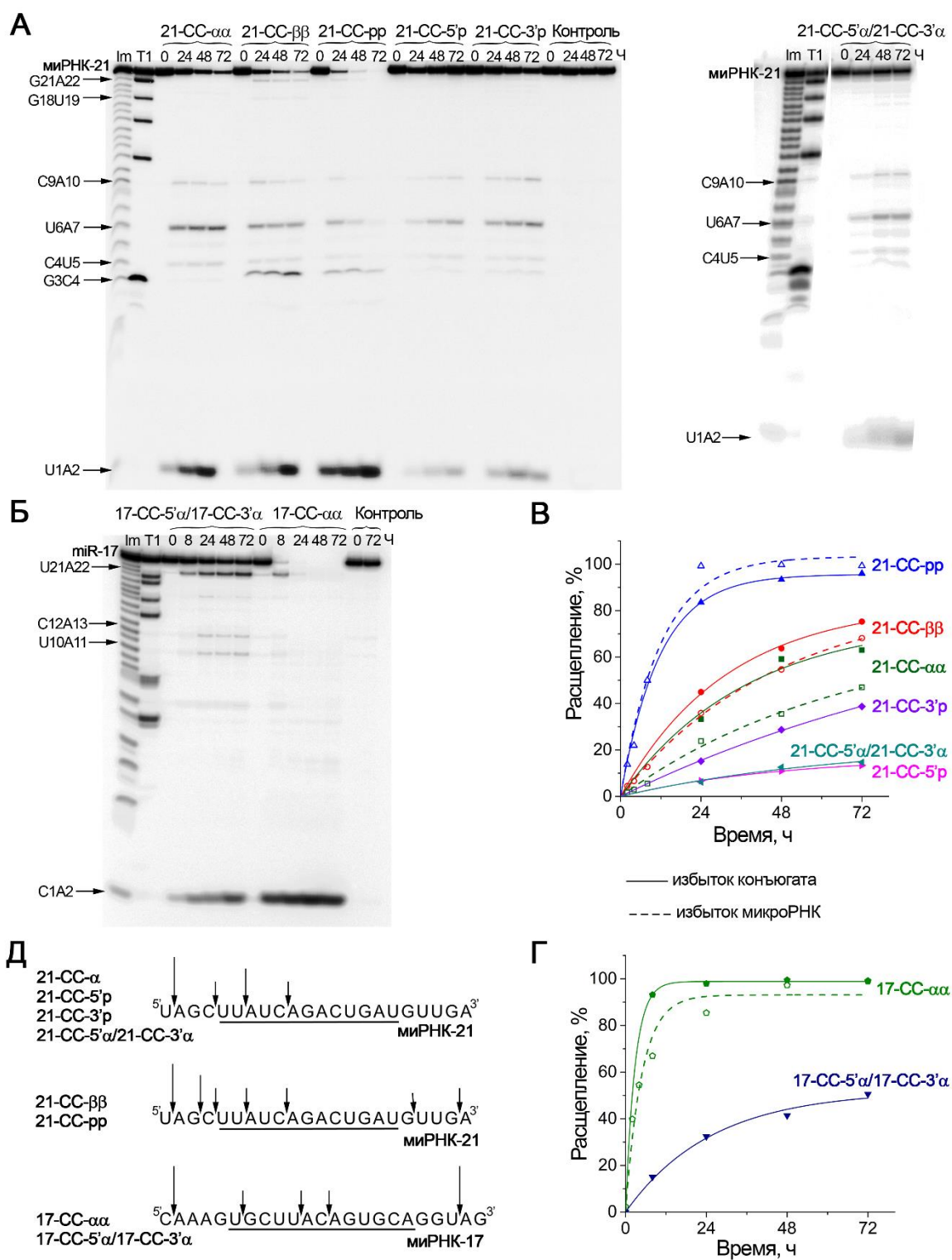


Рис. 22. Расщепление 5'-[32 P]-меченых миРНК-21 и миРНК-17 крабоподобными миРНКазами в условиях однооборотной реакции. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 и миРНК-17 миРНКазами 21-CC- $\alpha\alpha$, 21-CC- $\beta\beta$, 21-CC-pp, 21-CC-5'p, 21-CC-3'p, 21-CC-5' α /21-CC-3' α (**А**) и 17-CC-5' α /17-CC-3' α и 17-CC- $\alpha\alpha$ (**Б**). микроРНК (1 мкМ) и миРНКазу (5 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[32 P]-микроРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с миРНКазой (в часах). **В, Г** – кинетические зависимости расщепления миРНК-21 (**В**) и миРНК-17 (**Г**) под действием крабоподобных миРНКаз: в условиях однооборотной реакции –

сплошная линия, в условиях многооборотной реакции – пунктирная линия. Д – сайты расщепления микроРНК крабоподобными миРНКазами в условиях однооборотной реакции (показаны стрелками). Подчеркнутая последовательность обозначает область микроРНК, находящуюся в дуплексе с комплементарной миРНКазой.

Для оценки способности наиболее эффективных бис-пептидных структурных вариантов крабоподобных миРНКаз функционировать в истинном каталитическом режиме была проведена серия экспериментов в условиях многооборотного режима. Анализ кинетики расщепления показал, что в этих условиях 21-СС-pp и 17-СС-αα способны расщеплять множественные копии микроРНК с высокой эффективностью, сопоставимой с активностью в условиях однооборотной реакции (Рис. 23 А и Б, Рис. 22 В и Г). 21-СС-pp обеспечивал 100%-ную деградацию миРНК-21 уже через 24 ч инкубации ($\tau_{1/2}=8.7\pm0.6$), а 17-СС-αα приводил к 85%-ному расщеплению миРНК-17 за этот же период ($\tau_{1/2}=3.9\pm0.3$) (Рис. 23 А и Б, Рис. 22 В и Г, Таблица). Эти данные подтверждают, что исследуемые бис-пептидные крабоподобные миРНКазы способны функционировать в каталитическом режиме и эффективно расщеплять множественные копии микроРНК-мишени.

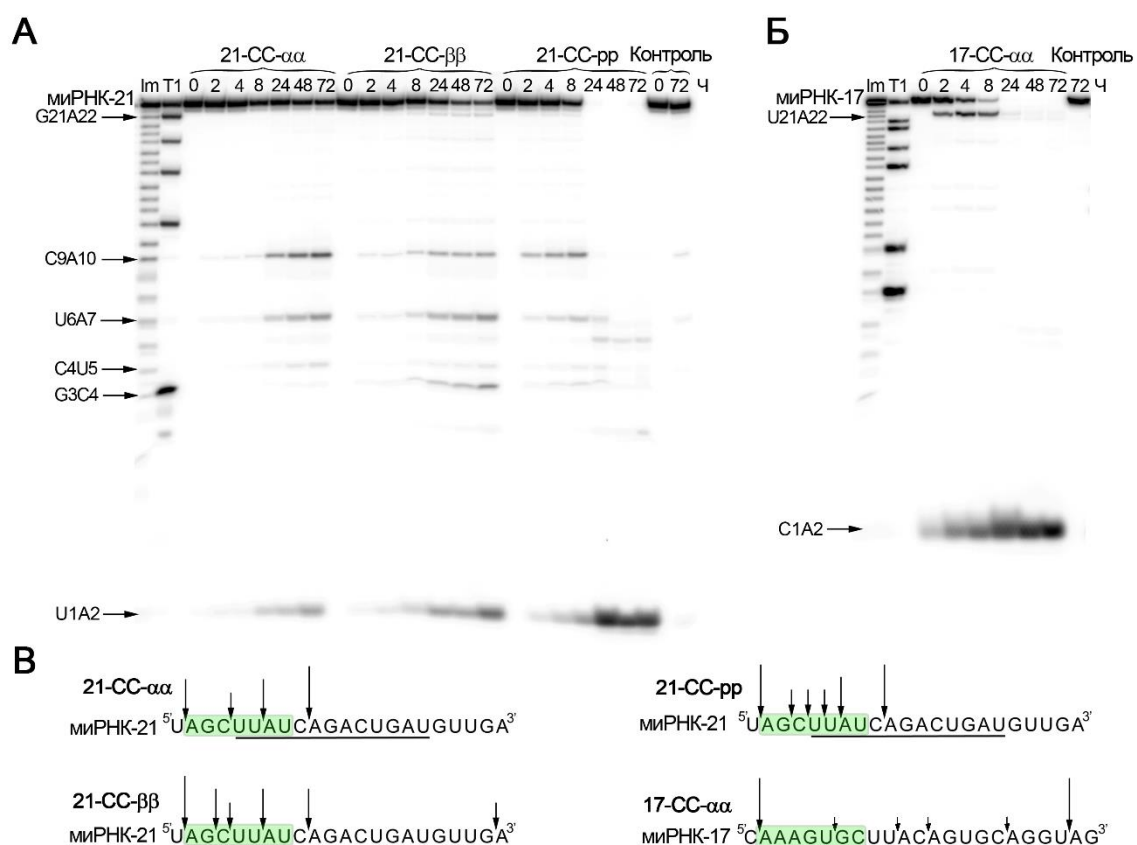


Рис.23. Расщепление 5'-[³²P]-меченых миРНК-21 и миРНК-17 крабоподобными миРНКазами в условиях многооборотной реакции. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 (**А**) и миРНК-17 (**Б**) миРНКазами 21-СС-αα, 21-СС-ββ, 21-СС-pp и 17-СС-αα. микроРНК (10 мкМ) и миРНКазу (5 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-микроРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с конъюгатом (в часах). **В** – сайты

расщепления микроРНК крабоподобными конъюгатами (показаны стрелками). Подчеркнутая последовательность обозначает область миРНК, находящуюся в дуплексе с комплементарной миРНКазой. Зеленым выделена затравочная область миРНК.

Исследование паттерна расщепления микроРНК показало, что в обоих режимах крабоподобные миРНКазы расщепляют мишень преимущественно по 5'- и 3'-концевым областям. Наиболее чувствительными к действию крабоподобных миРНКаз оказались пиримидин-А связи в последовательности мишени (**Рис. 22 Д, Рис. 23 В**). Для миРНК-21-направленных конъюгатов основными сайтами расщепления являлись связи U1-A2, U6-A7 и C9-A10, расположенные в 5'-концевой области микроРНК, а также наблюдалось слабое расщепление по связям C4-U5. 21-CC-ββ, и в меньшей степени 21-CC-pp, дополнительно обеспечивали слабое расщепление по сайту G3-C4 на 5'-конце и G21-A22 на 3'-конце микроРНК (**Рис. 22 Д, Рис. 23 В**). Таким образом, 5'-концевая область миРНК-21 характеризуется более высокой восприимчивостью к каталитическому воздействию, что, вероятно, связано с присутствием чувствительных к расщеплению связей в данной области молекулы. миРНКазы 17-CC-αα разрушала миРНК-17 только по пиримидин-А связям с преобладанием расщепления по сайтам C1-A2 в 5'-области и U21-A22 в 3'-концевой одноцепочечной области микроРНК. Также наблюдалось слабое вторичное расщепление в центральном районе дуплекса по связям U10-A11 и C12-A13 (**Рис. 22 Д, Рис. 23 В**). Таким образом, чувствительность фосфодиэфирных связей к действию крабоподобных миРНКаз снижается в следующем порядке: пиримидин-А >> пиримидин-N > G-N.

В контексте биологической активности направленная деструкция затравочной области микроРНК под действием крабоподобных миРНКаз может служить ключевым фактором, определяющим эффективность ингибирующего действия. Так, 21-CC-pp расщепляет миРНК-21 по сайтам G3-C4, C4-U5, и U6-A7, нарушая целостность критически важной функциональной детерминанты. В случае миРНК-17 отсутствие пиримидин-N связей в последовательности затравочной области определяет более низкую эффективность деградации крабоподобными миРНКазой. При этом расщепление других, отличных от пиримидин-А, связей также возможно, но происходит медленнее. Следует отметить, что быстрое накопление продуктов катализа пиримидин-А связей, особенно после расщепления первого 5'-меченого нуклеотида, может маскировать образование более медленно образующихся фрагментов.

Таким образом, среди разработанных структурных вариантов миРНК-21-направленных миРНКаз наибольшую рибонуклеазную активность продемонстрировал бис-пептидный конъюгат 21-CC-pp. Данный конъюгат превосходит по каталитической активности ранее описанные высокоэффективные миРНК-21-направленные конъюгаты, включая шпильчатую миРНКазу [45]. Так, 21-CC-pp обеспечивает полную деградацию мишени за 24 ч, тогда как

шпилечная миРНКаза требовала для достижения аналогичного результата 48 ч [45]. Предположительно, повышенная эффективность 21-СС-рр обусловлена способностью к одновременному расщеплению в 5'- и 3'-областях микроРНК-мишени, что обеспечивает образование коротких фрагментов, эффективно высвобождающихся из комплекса в процессе замещения интактной микроРНК.

3.3.3. Исследование рибонуклеазной активности вилкоподобных миРНКаз

Исследование рибонуклеазной активности вилкоподобных миРНКаз в условиях однооборотной реакции проводили в буфере I при 20-кратном избытке соединений по отношению к микроРНК. Было показано, что активность бис-пептидных FC сопоставима с монопептидными аналогами 21-FC- α /21-FC-р и 21-FC- β /21-FC-р, представляющими собой смесь рибонуклеаз с одним пептидом, статистически равновероятно присоединенным либо к 5'-фосфатной группе, либо к C1' атому дезоксирибозы. Вилкоподобные миРНКазы с одним или двумя пептидами в α -ориентации и рибонуклеазы с одним или двумя пептидами в β -ориентации имели схожую кинетику и эффективность расщепления миРНК-21. Время полурасщепления для 21-FC- α /21-FC-р и 21-FC- α р составило 23.7 ± 1.2 ч и 21.7 ± 2.0 ч соответственно, а для 21-FC- β /21-FC-р и 21-FC- β р – 36.6 ± 1.6 ч и 41.4 ± 1.1 ч, соответственно. Таким образом, включение второго пептида в структуру FC не приводило к заметному увеличению эффективности расщепления. Вместе с тем, ориентация пептидов оказывала заметное влияние на активность соединений: миРНКазы с пептидом в α -положении демонстрировали более высокую эффективность расщепления по сравнению с β -аналогами, которая составляла около 55% для 21-FC- α /21-FC-р и 21-FC- α р и 38% для 21-FC- β /21-FC-р и 21-FC- β р через 24 ч инкубации (Рис. 24 А и Б).

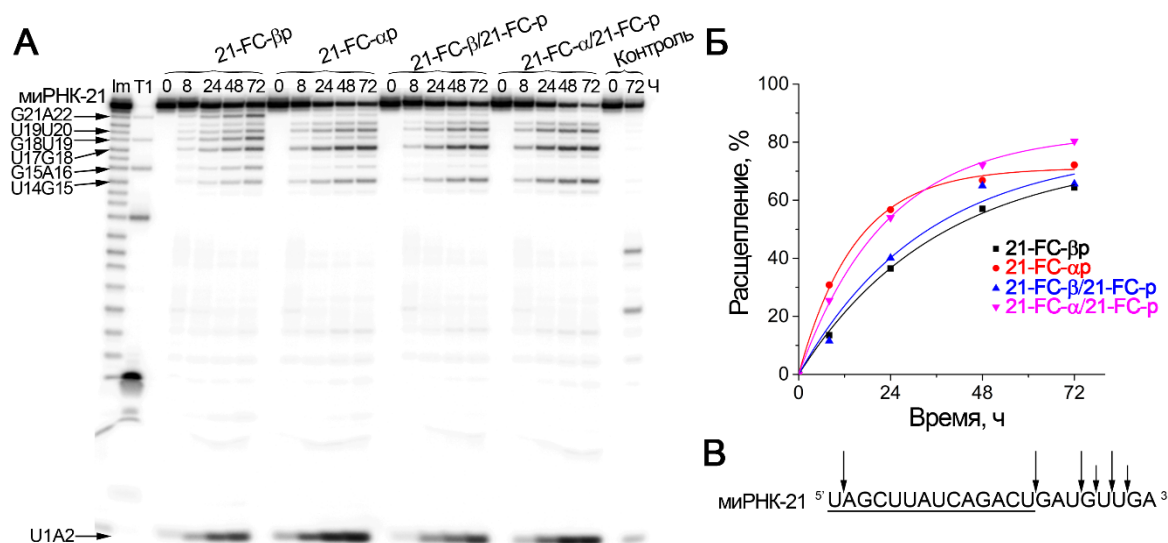


Рис. 24. Расщепление 5'-[32 P]-меченой миРНК-21 вилкоподобными миРНКазами в условиях однооборотной реакции. **А** – радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующий продукты расщепления миРНК-21 миРНКазами 21-FC- β р, 21-FC- α р, 21-FC-

β /21-FC-р и 21-FC- α /21-FC-р. микроРНК (1 мкМ) и миРНКазу (20 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-микроРНК инкубировали в отсутствие миРРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с конъюгатом (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК-21 под действием вилкоподобных миРНКаз. **В**– сайты расщепления микроРНК вилкоподобными конъюгатами (показаны стрелками). Подчеркнутая последовательность обозначает область миРНК, находящуюся в дуплексе с комплементарной миРНКазой.

Анализ паттерна расщепления показал, что моно- и бис-пептидные вилкоподобные миРНКазы расщепляли миРНК-21 преимущественно по U-N фосфодиэфирным связям в двух областях: на 5'-конце (U1-A2) и на одноцепочечном 3'-конце (U14-G15, U17-G18 и U19-U20). При использовании бис-пептидных миРНКаз паттерн расщепления расширялся, что было особенно выражено для 21-FC- β р, для которого наблюдался гидролиз практически по всем фосфодиэфирным связям в 3'-концевой одноцепочечной области микроРНК (**Рис.24 А и В**).

Рибонуклеазная активность вилкоподобных миРНКаз была также исследована в условиях многооборотной реакции. Анализ показал, что в этих условиях тенденции расщепления, наблюдаемые для однооборотной реакции, сохраняются. 21-FC- α р демонстрировал более высокую эффективность деградации микроРНК по сравнению с 21-FC- β р, когда степень расщепления миРНК-21 составила 70% и 37%, соответственно, через 24 ч. К 72 ч эффективность расщепления выравнивалась, достигая 79% для 21-FC- α р и 67% для 21-FC- β р (**Рис 25 А и Б**; значения k_{obs} см. в **Таблице 5**). В условиях избытка РНК-мишени расщепление происходило в одноцепочечной 3'-области миРНК-21 по связи U17-G18, а также в области гетеродуплекса по наиболее чувствительным фосфодиэфирным связям U1-A2, U6-A7 и C9-A10 (**Рис. 25 В**).

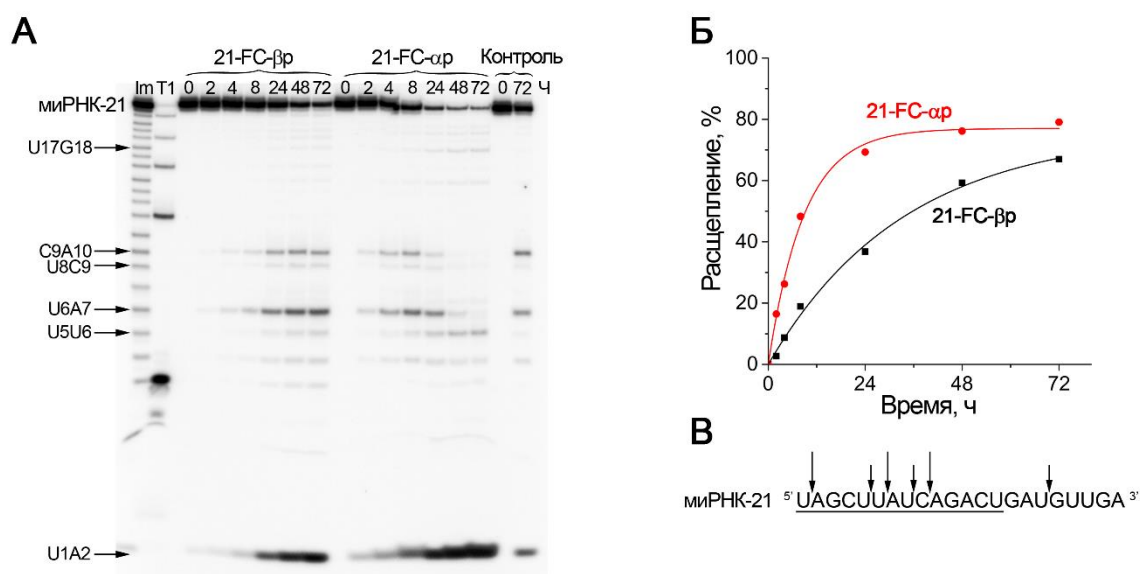


Рис. 25. Расщепление 5'-[³²P]-меченой миРНК-21 вилкоподобными миРНКазами в условиях многооборотной реакции. **А**– радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующего продукты расщепления миРНК-21 миРНКазами 21-FC- β р и 21-FC- α р. микроРНК (10 мкМ) и конъюгат (5 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °С в течение 72 ч.

Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-миРНК-21 инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с миРНКазой (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК-21 под действием вилкоподобных миРНКаз. **В** – сайты расщепления микроРНК под действием 21-FC-βр и 21-FC-αр (показаны стрелками). Подчеркнутая последовательность обозначает область микроРНК, находящуюся в дуплексе с комплементарной миРНКазой.

Сравнительный анализ эффективности расщепления микроРНК при различных соотношениях миРНКазы/мишень показал, что скорость расщепления миРНК-21 под действием вилкоподобных миРНКаз увеличивается в условиях многооборотного режима по сравнению с однооборотным. Например, значения $t_{1/2}$ для миРНКаз 21-FC-αр и 21-FC-βр снизились на 9 ч и на 3 ч, соответственно.

Сравнительный анализ каталитической активности вилкоподобных миРНКаз и ранее разработанной шпильчатой миРНКазы, на основе которой был разработан дизайн вилкоподобных структур [45,47], выявил снижение эффективности расщепления мишени при включении в структуру миРНКаз пептида через остаток дезоксирибозы. В условиях однооборотного катализа исходная шпильчатая миРНКазы, в которой каталитический пептид был присоединён через аминокислотный линкер к 5'-фосфатной группе распознающей компоненты, расщепляла миРНК-21 с эффективностью около 85% за 24 ч [45] и превосходила по активности монопептидные миРНКазы 21-FC-α/21-FC-р и 21-FC-β/21-FC-р в 1.5 и 2.3 раза, соответственно, а также наиболее активный бис-пептидный 21-FC-αр – в 1.4 раза. Снижение каталитической активности, вероятно, обусловлено ограниченной конформационной подвижностью пептидов при присоединении через остаток дезоксирибозы и их стерической интерференцией в бис-пептидных вариантах. Примечательно, что в условиях избытка РНК-мишени эффективность вилкоподобных миРНКаз возрастает, и скорость расщепления миРНК-21 под действием конъюгата 21-FC-αр становится сопоставимой с параметрами расщепления для разработанной ранее шпильчатой миРНКазы [47].

Комплексное исследование рибонуклеазной активности разработанных миРНКаз выявило, что их каталитическая эффективность обусловлена совокупностью факторов, связанных как с общей конфигурацией фермента, так и с природой субстрата, включая: структуру и протяженность распознающих доменов, количество, пространственную организацию и взаимное позиционирование каталитических пептидов, ориентацию каталитического домена относительно функциональных участков микроРНК, композицию буферной среды, а также нуклеотидную последовательность микроРНК-мишени.

Сравнительный анализ рибонуклеазной активности различных структурных вариантов миРНКаз выявил существенные различия каталитической эффективности исследуемых

ферментов. Двойные и петлеобразующие миРНКазы характеризовались умеренной активностью, при которой степень расщепления составляла 25-80% в течение 72 ч. В противоположность этому, крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы проявляли значительно более высокую каталитическую активность, обеспечивая 60-100% расщепление субстрата за 24 ч. Параллельно выявлено, что наиболее активные структурные варианты миРНКаз способны к многооборотному катализу: при двукратном молярном избытке микроРНК-субстрата крабоподобные миРНКазы обеспечивают полное расщепление мишени, а вилкоподобные варианты достигают 70% гидролиза субстрата в течение 24 ч.

Умеренная активность двойных и петлеобразующих миРНКаз, характеризующихся интернальным позиционированием пептидов в составе олигонуклеотидного домена, по всей вероятности, обусловлена укорочением гетеродуплексных районов и стерическими ограничениями пептидов. Более перспективными являются крабоподобные и вилкоподобные конструкции, которые формируют протяженные комплементарные участки с микроРНК-мишенью и характеризуются концевым расположением каталитических пептидов, обеспечивающим их повышенную конформационную подвижность и каталитическую свободу.

При этом, стоит отметить, что миРНКазы с интернальным расположением пептидов, несмотря на сниженную эффективность в отношении коротких микроРНК-молекул, могут проявлять высокую каталитическую активность в отношении более длинных типов РНК-мишеней, таких как клинически значимые мРНК, длинные некодирующие РНК и пре-микроРНК. Исследования с использованием тРНК дрожжей в качестве модельного субстрата продемонстрировали, что сиквенс-специфические двойные конъюгаты расщепляли мишень по пиримидин-N связям в целевом одноцепочечном участке, а также с высокой эффективностью гидролизуют G-N связи в областях РНК, удаленных от специфического сайта нацеливания [62]. Данные результаты позволяют предположить, что способность к множественному расщеплению целевых молекул обеспечивает двойным рибонуклеазам повышенную эффективность в отношении протяженных РНК-субстратов.

Исследование показало, что эффективность миРНКаз также в значительной степени зависит от количества и способа присоединения пептидов. Так, введение второго каталитического домена в структуру петлеобразующих и крабоподобных миРНКаз существенно повышает эффективность расщепления РНК. Введение второго каталитического пептида в структуру петлеобразующих миРНКаз увеличивало эффективность расщепления микроРНК в 4 раза, а в крабоподобные конструкции – до 10 раз. Выявленный синергический эффект, вероятно, достигается за счет создания дополнительных возможностей для синхронного действия каталитических гуанидиниевых групп с образованием гуанидин-гуанидиниевых диад вблизи целевых фосфодиэфирных связей, что является критически важным для катализа реакции

трансэтерификации РНК [60,75,90]. Примечательно, что для вилкоподобных миРНКаз существенного преимущества при введении дополнительного пептида в структуру выявлено не было, что, по всей вероятности, связано с взаимными стерическими ограничениями каталитических пептидов при их совместной локализации на одном остатке дезоксирибозы.

Существенное влияние на активность миРНКаз оказывает и способ присоединения пептидов к олигонуклеотидному домену. В рамках данного исследования проанализированы две основные стратегии присоединения: (1) прямое присоединение каталитических пептидов к 5'-концевому фосфату посредством аминоксильного линкера, и (2) конъюгирование пептидов через остаток дезоксирибозы посредством аминоксильного линкера в α - или β -конфигурации. Установлено, что присоединение пептидов к 5'-фосфату является наиболее эффективным подходом для конструирования миРНКаз, тогда как конъюгирование через остаток дезоксирибозы, по всей видимости, ограничивает конформационную подвижность каталитического домена и снижает эффективность катализа. Так, крабоподобная миРНКаз с присоединением пептида к 5'-фосфату (21-CC-pp) обеспечивает полную деградацию мишени в течение 24 ч, в то время как варианты с пептидом, присоединённым через остаток дезоксирибозы (21-CC- $\alpha\alpha$ и 21-CC- $\beta\beta$), демонстрируют лишь 25-35%-ное расщепление. Аналогично, монопептидные производные вилкоподобных миРНКаз с конъюгированием пептида посредством дезоксирибозы достигают лишь 40-55% деградации, тогда как ранее разработанные шпильчатые миРНКазы с присоединением пептида к 5'-фосфату катализировали 85% расщепление мишени [45].

В зависимости от общей структуры миРНКазы, присоединение пептида в α - или β -конфигурации может оказывать влияние на её рибонуклеазную активность. Для монопептидных миРНК-21-направленных ВС, биспептидных миРНК-17-направленных ВС и миРНК-21-направленных СС, каталитическая активность структур с пептидом в β -ориентации была выше по сравнению с соответствующими аналогами с пептидом в α -положении.

Исследования показали, что эффективность расщепления под действием миРНКаз в значительной степени зависит от нуклеотидной последовательности микроРНК, в особенности, одноцепочечных участков, доступных для каталитической атаки пептидов. Например, введение чувствительных к расщеплению сайтов в центральную область миРНК-21 увеличивало степень деградации мишени на 20% под действием двойной миРНКазы 21-DC. Аналогичная чувствительность к последовательности наблюдалась и при исследовании петлеобразующих миРНКаз, в которых сдвиг тринуклеотидной петли, приводящий к высвобождению восприимчивой к расщеплению С-А связи, способствовал увеличению деградации мишени в 1.5 раза. Зависимость рибонуклеазной активности от последовательности мишени показана и для крабоподобных миРНКаз: структурно аналогичные СС 21-CC- $\alpha\alpha$ и 17-CC- $\alpha\alpha$, направленные к

миРНК-21 и миРНК-17, соответственно, демонстрировали различную степень расщепления, которая напрямую коррелировала с наличием чувствительных С-А и U-А связей в 5'- и 3'-одноцепочечных концевых областях.

Таким образом, на основе проведенных исследований можно заключить, что эффективное конструирование миРНКаз должно базироваться на следующих принципах: формирование протяженного неразрывного гетеродуплекса с микроРНК-мишенью, присоединение каталитических пептидов через 5'-фосфатную группу посредством аминокислотного линкера, введение двух каталитических доменов с их пространственным разграничением для предотвращения взаимной стерической интерференции, а также наличие чувствительных сайтов в последовательности микроРНК-мишени.

3.4. Исследование эффективности расщепления микроРНК-мишеней под действием комбинации миРНКаз и РНКазы Н1

Действие классической антисмысловой технологии основано на привлечении внутриклеточных нуклеаз, в частности РНКазы Н1, для деградации РНК-мишеней. ДНК-подобные антисмысловые олигонуклеотиды, формируя гетеродуплекс с РНК, образуют субстрат для внутриклеточной эндорибонуклеазы РНКазы Н1, которая катализирует гидролиз РНК на расстоянии 6–10 нуклеотидов от 5'-конца РНК (примерно один виток спирали) [91].

Ранее было показано, что совместное применение миРНКазы и РНКазы Н1 приводит к синергическому расщеплению микроРНК-мишени, значительно увеличивая общую эффективность деградации [46,47]. Таким образом, в рамках данной работы было интересно оценить, проявляют ли новые разработанные структурные варианты миРНКаз РНКазы Н1-рекрутирующую способность.

Для исследования РНКазы Н1-активирующей способности синтезированных миРНКаз была проведена серия экспериментов по расщеплению микроРНК-мишеней в трех условиях: (1) под действием только миРНКазы; (2) в комплексе с неконъюгированным олигонуклеотидом в присутствии РНКазы Н1; (3) при совместном действии миРНКазы и РНКазы Н1. Реакции проводились в коммерческом буфере II, рекомендованном для реакций с участием РНКазы Н1.

Для подбора оптимальных условий ферментативного расщепления в экспериментах с двойными миРНКазами были протестированы две концентрации РНКазы Н1: 100 и 5 ед.акт./мл. В дальнейшем, для обеспечения корректного сопоставления данных по эффективности расщепления микроРНК в условиях резкого экспоненциального накопления продуктов реакции, образующихся в результате совместного действия РНКазы Н1 и миРНКазы, была выбрана концентрация 5 ед.акт./мл.

3.4.1. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии двойных миРНКаз и РНКазы Н1

Дизайн двойных миРНКаз был реализован таким образом, чтобы гетеродуплексы DC с комплементарными микроРНК являлись потенциальными субстратами для РНКазы Н1. Для этого распознающие домены А и В в составе миРНКаз были синтезированы длиной 8–10 н., достаточной для взаимодействия с РНКазой Н1 и последующего расщепления ферментом (**Рис. 2, Таблица 2**). Как уже было сказано выше, в распознающих доменах аденины были заменены на 2-аминоаденины для увеличения эффективности связывания DC с микроРНК. Ранее было показано, что включение 2-аминоаденинов в последовательность антисмысловых олигонуклеотидов не препятствует активности РНКазы Н1 [92].

Исследование рибонуклеазной активности DC в присутствии РНКазы Н1 проводили для миРНК-17, миРНК-155 и миРНК-21 в комплексе с миРНКазами 17-DC, 155-DC и 21-DC или соответствующими двойными олигонуклеотидами 17-D-ON и 155-D-ON, плечи которых были соединены двойным триэтиленгликолиевым линкером (**Таблица 2**). Результаты исследования эффективности расщепления микроРНК в комплексе с адресующим олигонуклеотидом или двойной миРНКазой в 20-кратном избытке в присутствии фермента РНКазы Н1 в концентрациях 5 и 100 ед.акт./мл представлены на **Рис. 26**.

Анализ расщепления микроРНК подтвердил, что наличие 2-аминоаденинов в структуре олигонуклеотида не препятствует распознаванию гетеродуплекса РНКазой Н1. Анализ паттернов расщепления миРНК-17 под действием РНКазы Н1 показал, что сайты расщепления мишени в гетеродуплексе с ON и DC различаются (**Рис. 26 А и В**). В гетеродуплексе с 17-D-ON РНКазы Н1 расщепляет миРНК-17 преимущественно по связям G7-C8, U10-A11 и U21-A22, тогда как при инкубации микроРНК совместно с 17-DC и РНКазой Н1 к сайтам расщепления микроРНК в области гетеродуплекса, характерным для РНКазы Н1, добавляются сайты расщепления, специфичные для конъюгата – U10-A11, A11-C12 и C12-A13 (**Рис. 26 А и В**). Исследование кинетики расщепления миРНК-17 показало, что как при концентрации РНКазы Н1 5 ед.акт./мл, так и при концентрации 100 ед.акт./мл суммарная эффективность расщепления миРНК-17 в комплексе с миРНКазой в 1.5 раза выше, чем в комплексе с олигонуклеотидом (**Рис. 26 Б**). Из рисунка видно, что расщепление микроРНК в присутствии РНКазы Н1 достигает плато менее чем через 2 ч инкубации. К этому времени суммарная эффективность расщепления мишени при совместном действии 17-DC и РНКазы Н1 в концентрации 5 и 100 ед.акт./мл достигает 44 и 92%, соответственно, в сравнении с 25 и 76%, наблюдаемыми при РНКазы Н1-индуцируемом расщеплении микроРНК в гетеродуплексе с 17-D-ON (**Рис. 26 Б**). Совместное действие двойной

миРНКазы и РНКазы H1 увеличивало скорость расщепления миРНК-17 более чем в 10 раз по сравнению с действием только миРНКазы и в 1.5 раза – по сравнению с РНКазой H1.

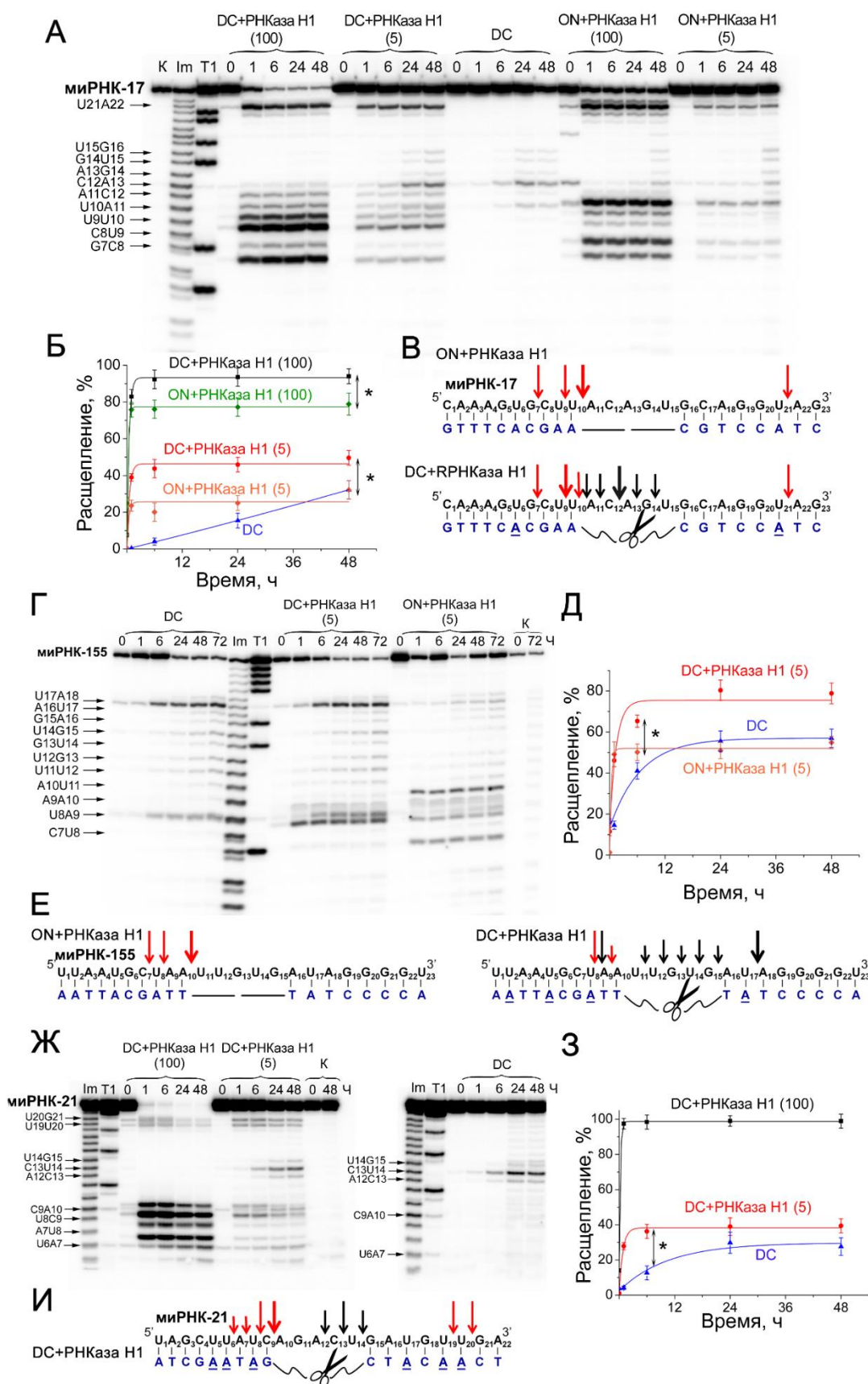


Рис. 26. Расщепление синтетических 5'-[³²P]-микроРНК в комплексе с двойными миРНКазы (DC) или двойными олигонуклеотидами (D-ON) в присутствии РНКазы H1. А, Г, Ж –

радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17, миРНК-155 и миРНК-21, соответственно, в условиях 20-кратного избытка миРНКаз или олигонуклеотидов. Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-микроРНК (1 мкМ) и ДС или ОН (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 48–72 ч. 100 и 5 – концентрация РНКазы Н1 (ед.акт./мл). Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. К – контроль, 5'-[³²P]-микроРНК инкубировали в присутствии РНКазы Н1 (100 ед.акт./мл) и в отсутствие ОН и ДС. Над дорожками обозначено время инкубации микроРНК с конъюгатами (в часах). **Б, Д, З** – кинетические зависимости расщепления микроРНК в комплексе с ДС или ОН в присутствии РНКазы Н1. * статистически значимые отличия с $p < 0.05$. **В, Е, И** – сайты расщепления микроРНК в комплексе с ДС или ОН в присутствии РНКазы Н1. Красными стрелками показаны сайты расщепления микроРНК под действием РНКазы Н1, черными стрелками – под действием двойной миРНКазы. А – 2-аминоаденин.

Сходные закономерности наблюдались в экспериментах по расщеплению миРНК-155 (**Рис. 26 Г – Е**). Основными сайтами расщепления микроРНК в составе гетеродуплекса с олигонуклеотидом 155-D-ОН в присутствии РНКазы Н1 были связи U17-A18, A10-U11, U8-A9 и C7-U8. При инкубации миРНК-155 совместно с 155-ДС в присутствии РНКазы Н1 паттерн расщепления расширялся с формированием дополнительных сайтов, характерных для двойной миРНКазы – U17-A18, U8-A9 и A9-A10, а также наблюдалось смещение сайт-селективности (**Рис. 26 Г и Е**). Так, степень расщепления миРНК-155 по сайтам U17-A18 и U8-A9 в присутствии РНКазы Н1 в комплексе с ДС увеличивалась с 6% до 25% и с 6% до 20%, соответственно. Исследование кинетики расщепления миРНК-155 в присутствии РНКазы Н1 в концентрации 5 ед.акт./мл показало, что суммарная эффективность расщепления миРНК-155 в комплексе с двойной миРНКазой, как и в случае миРНК-17, почти в 1.5 раза выше, чем в комплексе с олигонуклеотидом (**Рис. 26 Г и Д**). При совместном действии 155-ДС и РНКазы Н1 расщепление миРНК-155 достигает плато уже к 6 ч инкубации, при этом степень расщепления достигает 65%, в 2 раза превышая степень деградации при использовании только ДС. Максимальная степень расщепления микроРНК в присутствии РНКазы Н1, достигаемая через 48 ч инкубации, составляет 55% в комплексе с олигонуклеотидом и 80% в дуплексе с миРНКазой (**Рис. 26 Г и Д**).

Совместное действие двойной миРНКазы и РНКазы Н1 также было исследовано в реакции расщепления миРНК-21 (**Рис. 26 Ж – И**). Полученные данные показали, что в присутствии РНКазы Н1 в сниженной концентрации (5 ед.акт./мл) продукты расщепления миРНК-21 отчетливо делятся на 3 группы: (1) – продукты, полученные при расщеплении микроРНК в одноцепочечном участке под действием 21-ДС (сайты A12-C13, C13-U14 и U14-G15); (2) и (3) – продукты, полученные при расщеплении 5'- и 3'-области микроРНК в составе гетеродуплекса под действием РНКазы Н1 (сайты U6-A7, U8-C9, C9-A10 и U19-G20, U20-G21, соответственно) (**Рис. 26 Ж и И**). При этом эффективность расщепления в этих условиях достигала плато к 6 ч инкубации и составляла 40% (**Рис. 26 Ж и З**). При увеличении концентрации РНКазы Н1 до 100

ед.акт./мл уже в первый час инкубации наблюдалось практически полное расщепление миРНК-21.

Таким образом, замена нескольких азотистых оснований аденина на 2-аминоаденины в структуре распознающего домена двойных миРНКаз позволило обеспечить не только эффективное связывание миРНКазы с мишенью, но также сохранить способность ДС рекрутировать РНКазу Н1, значительно увеличивая таким образом скорость деградации микроРНК.

3.4.2. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии петлеобразующих миРНКаз и РНКазы Н1

Анализ совместного действия петлеобразующих миРНКаз и РНКазы Н1 (5 ед.акт./мл) проводили в реакции с миРНК-17 и 20-кратным избытком петлеобразующего олигонуклеотида или миРНКазы с одним (17-ВС-α и 17-ВС-β) или двумя пептидами (17-ВС-ββ). Результаты экспериментов представлены на **Рис. 27** и **Рис. 28**. При совместном применении комплементарного олигонуклеотида 17-В-ОН и РНКазы Н1 расщепление мишени наблюдалось преимущественно в 3'-области РНК по связи G19-G20 (**Рис. 27 А III**). Кривая расщепления достигала плато к 1 ч, когда максимальная деградация РНК составляла 30% (**Рис. 27 А III**). При совместном применении РНКазы Н1 с конъюгатами 17-ВС-α (**Рис. 27 А II**) и 17-ВС-β (**Рис. 27 А V**) наблюдалась реорганизация характерных паттернов расщепления как для миРНКазы, так и для РНКазы Н1, что, вероятно, обусловлено конформационными перестройками в зоне сопряжения одноцепочечного участка с дуплексной структурой. В этих условиях основной сайт расщепления миРНКазой смещался с C12-A13 на U10-A11 (**Рис. 27 А II, V**), а РНКазой Н1, помимо основного сайта G19-G20, дополнительно обеспечивала слабое расщепление по сайтам G7-C8 и U6-G7 в 5'-области микроРНК.

Эффективность расщепления миРНК-17 под действием комбинации РНКазы Н1 и петлеобразующих миРНКаз многократно превышала как действие только миРНКаз, так и совместный эффект РНКазы Н1 и олигонуклеотидов. Суммарная эффективность расщепления миРНК-17 под действием РНКазы Н1 и миРНКазы 17-ВС-α или 17-ВС-β достигала приблизительно 70% через 1 ч инкубации, что в 2.3 раза превышало расщепление миРНК-17 РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом и в 20 раз – деградацию под действием петлеобразующих миРНКаз (**Рис. 27 Б**), демонстрируя синергическое действие 17-ВС-α/β и РНКазы Н1. В присутствии РНКазы Н1 скорость расщепления мишени под действием петлеобразующих миРНКаз значительно возрастала. Накопление продуктов, образуемых в результате каталитического действия ВС наблюдалось уже в течение первого часа инкубации, а степень расщепления по сайту U10-A11 увеличивалась в 10 раз по сравнению с реакцией,

проводимой в отсутствие фермента (**Рис. 27 Г**). Активность РНКазы Н1 также возрастала за счет увеличения степени расщепления по сайту G19-G20 и появления дополнительных разрывов по связям G7-C8 и U6-G7, что проявлялось в суммарном увеличении эффективности расщепления в 1.5 раза к 1 ч инкубации (**Рис. 27 Д**). Следует отметить, что совместное применение РНКазы Н1 с миРНКазой 17-BC-β, содержащей пептид в β-положении, обеспечивало более высокий уровень деградации мишени, чем в комбинации с 17-BC-α. Для 17-BC-β наблюдалось более выраженное усиление рибонуклеазной активности (**Рис. 27 Б, Г, Д**), что, вероятно, связано с более предпочтительной природной β-конфигурацией пептида.

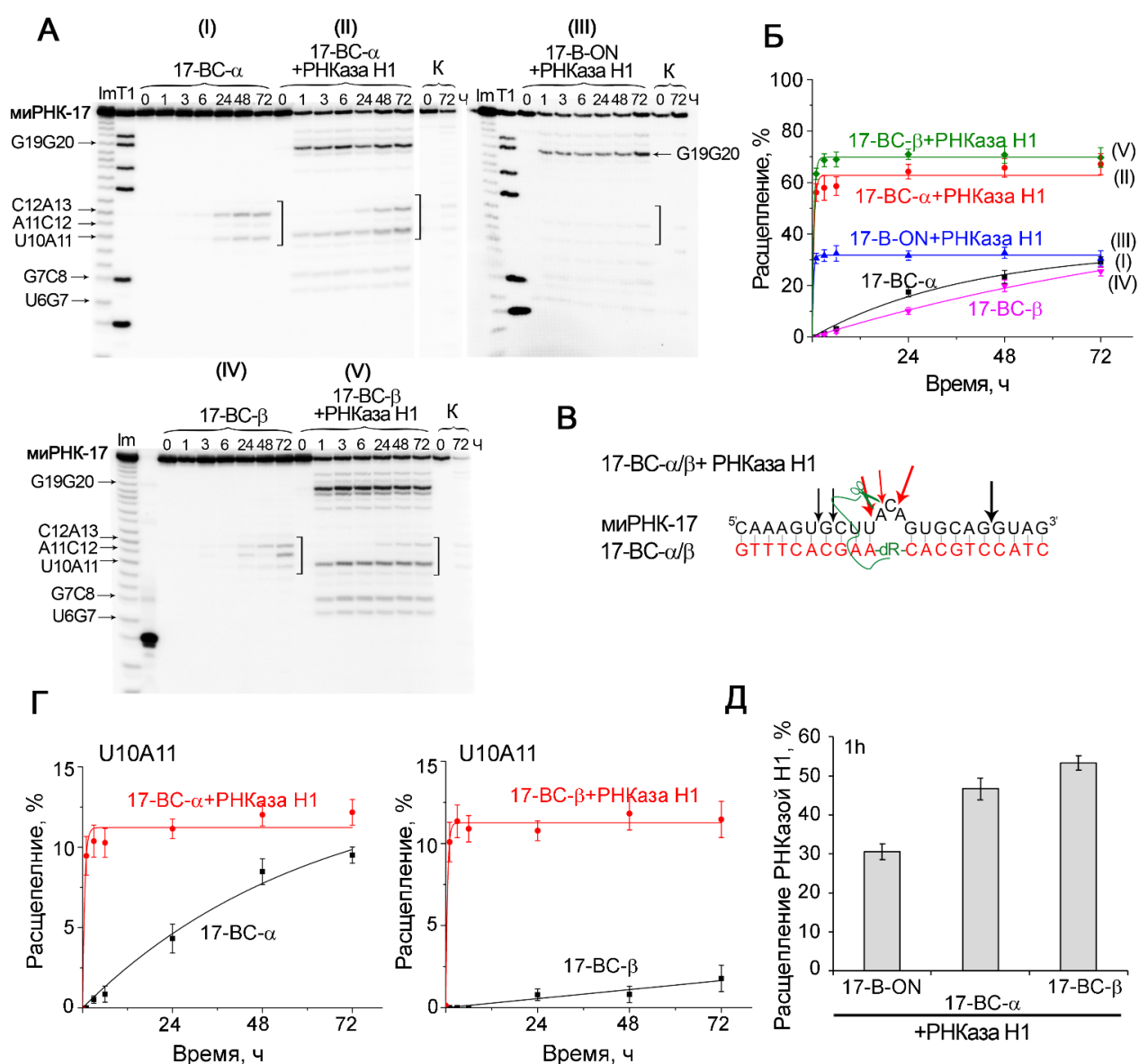


Рис. 27. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-17 в комплексе с петлеобразующим олигонуклеотидом 17-В-ОН или миРНКазой 17-BC-α или 17-BC-β в присутствии РНКазы Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 миРНКазой 17-BC-α (**I**), комбинацией 17-BC-α и РНКазы Н1 (**II**), РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 17-В-ОН (**III**), миРНКазой 17-BC-β (**IV**), комбинацией 17-BC-β и РНКазы Н1 (**V**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-микроРНК (1 мкМ)

и ВС или В-ОН (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 72 ч. Концентрация РНКазы Н1 – 5 ед.акт./мл. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. К – контроль, 5'-[³²P]-миРНК-17 инкубировали в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие олигонуклеотида и миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). Квадратной скобкой обозначена область выпетливания РНК. **Б** – кинетические зависимости расщепления микроРНК миРНКазой и/или РНКазой Н1. **В** – основные сайты расщепления миРНК-17 при совместном действии петлеобразующих миРНКаз 17-ВС-α или 17-ВС-β (красные стрелки) и РНКазы Н1 (черные стрелки). **Г** – кинетические зависимости расщепления миРНК-17 по сайту U10-A11 миРНКазой 17-ВС-α или 17-ВС-β отдельно (черная кривая) или в комбинации с РНКазой Н1 (красная кривая). **Д** – степень расщепления миРНК-17 РНКазой Н1 в дуплексе с олигонуклеотидом или в комбинации с ВС через 1 ч инкубации (учитывалось расщепление только по сайтам, характерным для РНКазы Н1).

Еще более выраженное увеличение эффективности и скорости расщепления микроРНК было обнаружено при совместном действии РНКазы Н1 и бис-пептидной петлеобразующей миРНКазы 17-ВС-ββ (**Рис. 28 А II**). Такая комбинация обеспечивала полную деградацию миРНК-17 менее чем за 24 ч инкубации (**Рис. 28 Б**). Как и в случае моно-пептидных аналогов, расщепление наблюдалось как в области петли, что обеспечивалось каталитическим действием миРНКазы, так и в 5'- и 3'- дуплексных областях комплекса в результате активности РНКазы Н1. При этом интенсивность нуклеазной деградации по отдельным сайтам значительно увеличивалась. Уже на ранних этапах реакции (6 ч) наблюдалось накопление коротких продуктов расщепления, соответствующих сайтам G7-C8 и U6-G7, в то время как остальные чувствительные сайты в области петли к этому моменту уже были полностью разрушены (**Рис. 29 А II, С**). Примечательно, что расщепление по сайтам G7-C8 и U6-G7 под действием РНКазы Н1 становится возможным только после предварительного расщепления области петли миРНКазой.

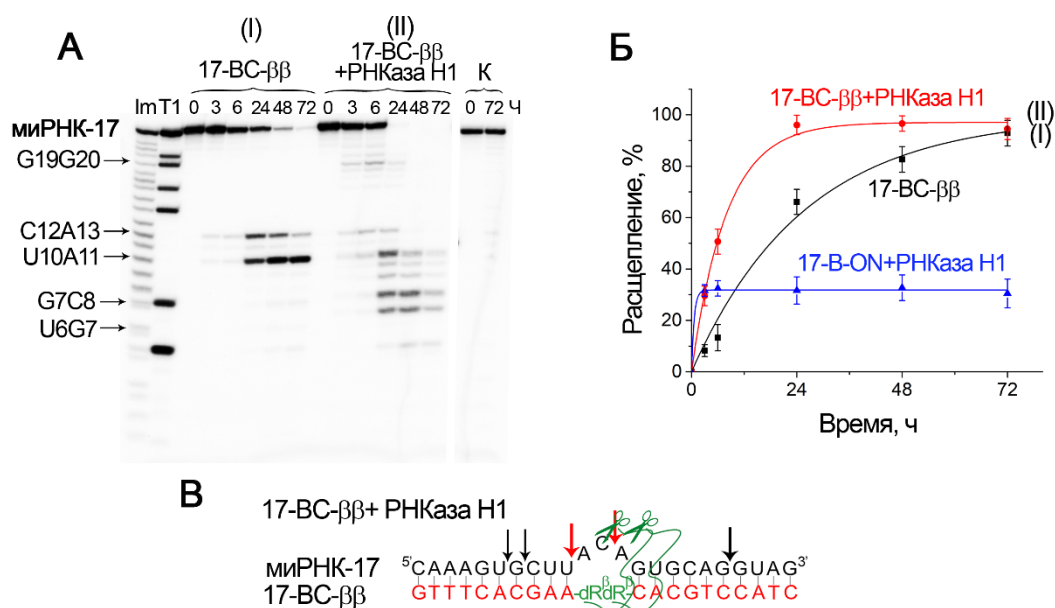


Рис. 28. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-17 миРНКазой с двумя пептидами 17-ВС-ββ и/или РНКазой Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие

продукты расщепления миРНК-17 под действием миРНКазы 17-BC-ββ (**I**) и при совместном действии 17-BC-ββ и РНКазы Н1 (**II**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-микроРНК (1 мкМ) и ВС (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 72 ч. Концентрация РНКазы Н1 5 ед.акт./мл. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. К – контроль, 5'-[³²P]-миРНК-17 инкубировали в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). Квадратной скобкой обозначена область выпетливания РНК. **Б** – кинетические зависимости расщепления микроРНК под действием 17-BC-ββ и/или РНКазы Н1. Для сравнения приведена кривая, демонстрирующая расщепление миРНК-17 РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом В-ОН. **В** – основные сайты расщепления миРНК-17 при совместном действии петлеобразующей миРНКазы 17-BC-ββ (красные стрелки) и РНКазы Н1 (черные стрелки).

3.4.3. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии крабоподобных миРНКаз и РНКазы Н1

Анализ совместного применения крабоподобных миРНКаз и РНКазы Н1 проводили для наиболее активных миРНКаз – 21-СС-pp, направленной к миРНК-21, и 17-СС-αα, направленной к миРНК-17.

В ходе исследования было выявлено, что в буфере II, содержащем ионы Mg^{2+} (8 мМ), наблюдалось замедление кинетики расщепления мишеней под действием крабоподобных миРНКаз (**Рис. 29**). В частности, для 21-СС-pp наблюдалась 12-ти часовая лаг-фаза, после которой происходил резкий экспоненциальный рост, при котором достигалось 98%-ное расщепление мишени к 24 часам, что превосходило эффективность, наблюдаемую при использовании буфера I, не содержащего магний (**Рис. 29 А, 30 А**). миРНКазы 17-СС-αα демонстрировала более выраженное замедление реакции в буфере II: степень деградации микроРНК снижалась вдвое и составляла 49% через 24 ч (**Рис. 29 Б, 31 А**). Согласно расчётам с использованием сервиса DINAMelt, температура плавления дуплексов миРНК-21/21-СС-pp и миРНК-17/17-СС-αα в присутствии ионов Mg^{2+} повышается приблизительно на 2 °С (с 40.1 °С до 42.7 °С и с 48.4 °С до 50.6 °С, соответственно) по сравнению с буферными условиями без магния. Ионы Mg^{2+} могут стабилизировать как дуплексы, так и внутримолекулярные структуры микроРНК и миРНКаз, потенциально препятствуя формированию продуктивных комплексов миРНК/миРНКазы и снижая скорость деградации мишени. Кроме того, стабилизация гетеродуплексов в присутствии ионов Mg^{2+} может приводить к снижению скорости их диссоциации, ограничивая число каталитических оборотов реакции и, соответственно, уменьшая общую эффективность расщепления микроРНК.

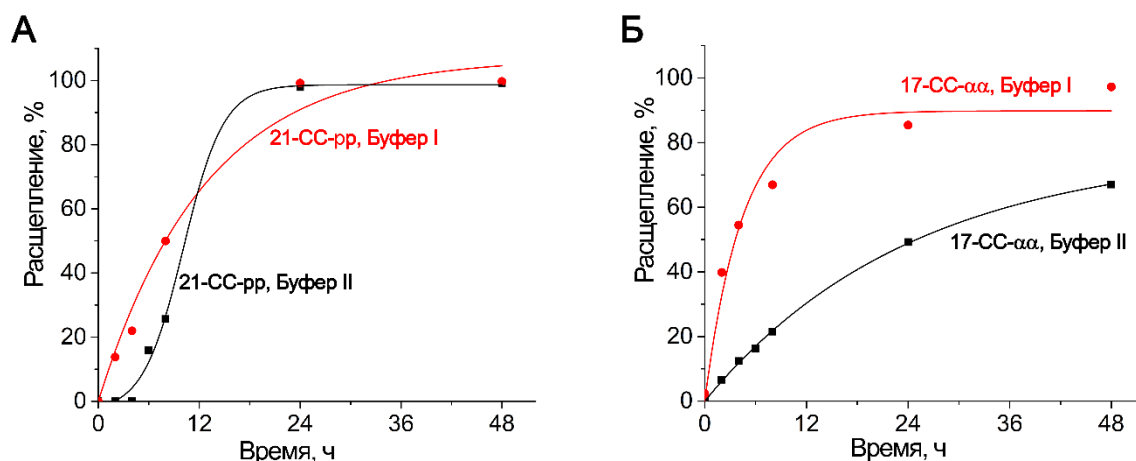


Рис. 29. Кинетические зависимости расщепления 5'-[³²P]-миРНК-21 (А) и 5'-[³²P]-миРНК-17 миРНКазой 21-СС-рр и 17-СС-αα в двух буферных системах. Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-микроРНК (10 мкМ) и миРНКазой (5 мкМ) инкубировали в буфере I или II при 37 °С в течение 48 ч.

Оценка эффективности расщепления миРНК-21 и миРНК-17 в присутствии РНКазы Н1 в концентрации 5 ед.акт./мл в комплексе с крабоподобной миРНКазой или соответствующим олигонуклеотидом проводили в условиях двукратного избытка микроРНК (10 мкМ) по отношению к миРНКазе или олигонуклеотиду (5 мкМ) (**Рис. 30, Рис. 31**). В этих условиях РНКазы Н1 обеспечивала низкую степень расщепления миРНК-21 и миРНК-17 в комплексе с соответствующими олигонуклеотидами, которая не превышала 9% через 48 ч инкубации (**Рис. 30 Б и Рис. 31 Б**).

Совместное применение РНКазы Н1 и крабоподобных миРНКаз вызывало резкое увеличение скорости и степени расщепления микроРНК-мишени (**Рис. 30 и 31**). Наиболее выраженное ускорение реакции наблюдалось в первые часы инкубации. При одновременном действии 21-СС-рр и РНКазы Н1 степень деградации миРНК-21 достигала 70% уже через 4 ч, тогда как при независимом применении ферментов уровень расщепления не превышал 4% за этот же период времени (**Рис. 30 В**). Аналогично, при совместном действии 17-СС-αα и РНКазы Н1 расщепление миРНК-17 достигало 38% через 4 ч, что значительно превышало активность каждого фермента по отдельности – степень деградации составляла лишь 12% и 4%, соответственно (**Рис. 31 В**).

МиРНК-21 оказалась более чувствительной к синергическому расщеплению крабоподобной миРНКазой и РНКазой Н1, чем миРНК-17. Полная деградация миРНК-21 при совместном действии 21-СС-рр и РНКазы Н1 достигалась уже через 12 ч инкубации, тогда как для миРНК-17 – через 48 часов (**Рис.30 Б, Рис. 31 Б**). Обнаруженные различия могут быть обусловлены несколькими факторами: (1) нуклеотидной последовательностью, (2) термодинамическими параметрами внутримолекулярных структур различных микроРНК в присутствии ионов магния, (3) структурой крабоподобных конъюгатов. В частности,

присутствие остатка дезоксирибозы (dR) в структуре 17-СС- $\alpha\alpha$ может ограничивать подвижность пептидов, снижая таким образом эффективность синергического действия с РНКазой Н1.

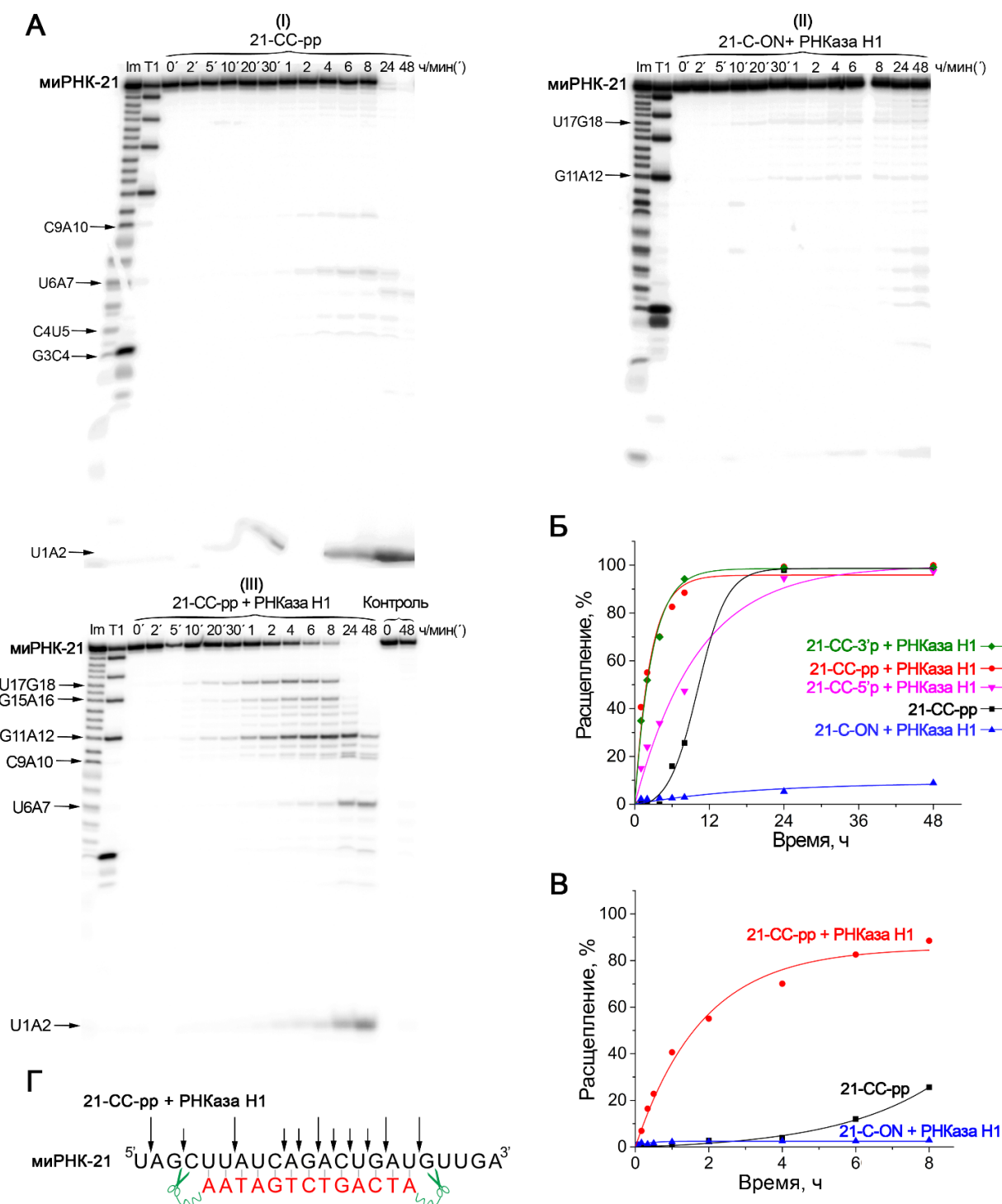


Рис.30. Расщепление синтетической 5'-[32 P]-миРНК-21 в комплексе с олигонуклеотидом 21-С-ОН или крабоподобной миРНКазой 21-СС-pp в присутствии РНКазы Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 миРНКазой 21-СС-pp (**I**), РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 21-С-ОН (**II**), комбинацией 21-СС-pp и РНКазы Н1 (**III**). Дуплексы, сформированные 5'-[32 P]-микроРНК (10 мкМ) и СС или С-ОН (5 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 48 ч. Концентрация РНКазы Н1 – 5 ед.акт./мл. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[32 P]-миРНК-21 инкубировали в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие

олигонуклеотида и миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления микроРНК миРНКазой 21-СС-рр, 21-СС-3'-р и 21-СС-5'-р и/или РНКазой Н1 в течение 48 ч инкубации. **В** – кинетические зависимости расщепления микроРНК миРНКазой 21-СС-рр и/или РНКазой Н1 в первые 8 ч инкубации. **Г** – основные сайты расщепления миРНК-21 при совместном действии крабовидной миРНКазы 21-СС-рр и РНКазы Н1.

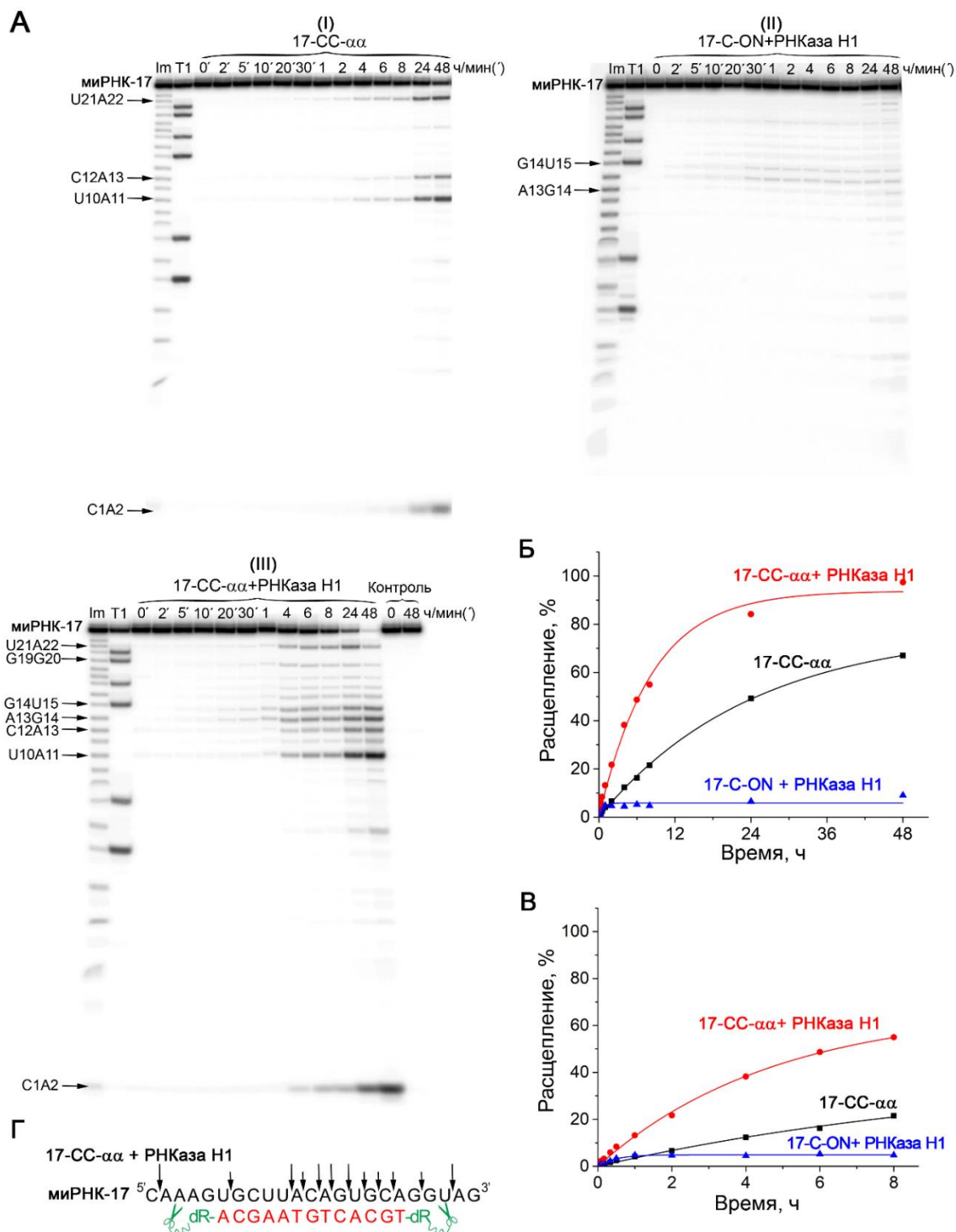


Рис.31. Расщепление синтетической 5'-[32 P]-миРНК-17 в комплексе с олигонуклеотидом 17-С-ОН или крабовидной миРНКазы 17-СС- $\alpha\alpha$ в присутствии РНКазы Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 миРНКазой 17-СС- $\alpha\alpha$ (**I**), РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 17-С-ОН (**II**),

комбинацией 17-СС- $\alpha\alpha$ и РНКазы Н1 (**III**). Дуплексы, сформированные 5'-[^{32}P]-микроРНК (10 мкМ) и СС или С-ОН (5 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 48 ч. Концентрация РНКазы Н1 – 5 ед.акт./мл. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[^{32}P]-миРНК-17 инкубировали в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие олигонуклеотида и миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления микроРНК миРНКазой и/или РНКазой Н1 в течение 48 ч инкубации. **В** – кинетические зависимости расщепления микроРНК миРНКазой и/или РНКазой Н1 в первые 8 ч инкубации. **Г** – основные сайты расщепления миРНК-17 при совместном действии крабоподобной миРНКазы 17-СС- $\alpha\alpha$ и РНКазы Н1.

Анализ паттерна расщепления микроРНК показал, что совместное применение крабоподобных миРНКаз и РНКазы Н1 приводит к значительному увеличению скорости накопления продуктов, образующихся в результате расщепления микроРНК в центральной области гетеродуплекса под действием РНКазы Н1 (**Рис. 30 А, Г; Рис. 31 А, Г**). Анализ электрофоретических изображений показал, что РНКазы Н1 катализируют расщепление всех фосфодиэфирных связей в молекуле РНК, начиная с пятого нуклеотида в образующемся РНК-ДНК-гетеродуплексе, при этом первые пять нуклеотидов служат областью распознавания и связывания для РНКазы Н1. Одновременно с этим выявлено, что при совместном применении ферментов наблюдалось не только РНКазы Н1-индуцированное усиление расщепления в области гетеродуплекса, но и происходила конформационная активация миРНКазы с индуцированием расщепления по дополнительным сайтам в одноцепочечных 5'-областях микроРНК. Так, дополнительно наблюдалось расщепление миРНК-21 по сайтам U17-G18 под действием 21-СС- rr и миРНК-17 по связи G19-G20 под действием 17-СС- $\alpha\alpha$ (**Рис. 30 А, Г; Рис. 31 А, Г**), что может быть обусловлено усилением активности пептида, расположенного на 3'-конце распознающей компоненты миРНКазы.

С целью определения важности бис-пептидной структуры крабоподобных миРНКаз для реализации синергического действия с РНКазой Н1, а также исследования роли позиции присоединения пептида (3'- или 5'-конец) в эффективности катализа, были проведены эксперименты по расщеплению миРНК-21 при совместном действии РНКазы Н1 и монопептидных миРНКаз 21-СС-5'р или 21-СС-3'р (**Рис. 32, Рис. 30 Б**). Несмотря на то, что рибонуклеазная активность 21-СС-5'р и 21-СС-3'р в буферном растворе II была крайне низкой и практически не определялась на электрофоретическом изображении, добавление РНКазы Н1 приводило к значительному усилению деградации миРНК-21. При этом эффект был в 3.6 раз более значительным для 21-СС-3'р по сравнению с 21-СС-5'р. В частности, в присутствии РНКазы Н1 степень расщепления мишени возрастала в 172 раза для 21-СС-3'р, что сопоставимо с эффектом для бис-пептидного варианта 21-СС- rr , и в 47.5 раз для 21-СС-5'р (**Рис. 30 Б**). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о ключевой роли 3'-пептида в обеспечении синергического действия с РНКазой Н1.

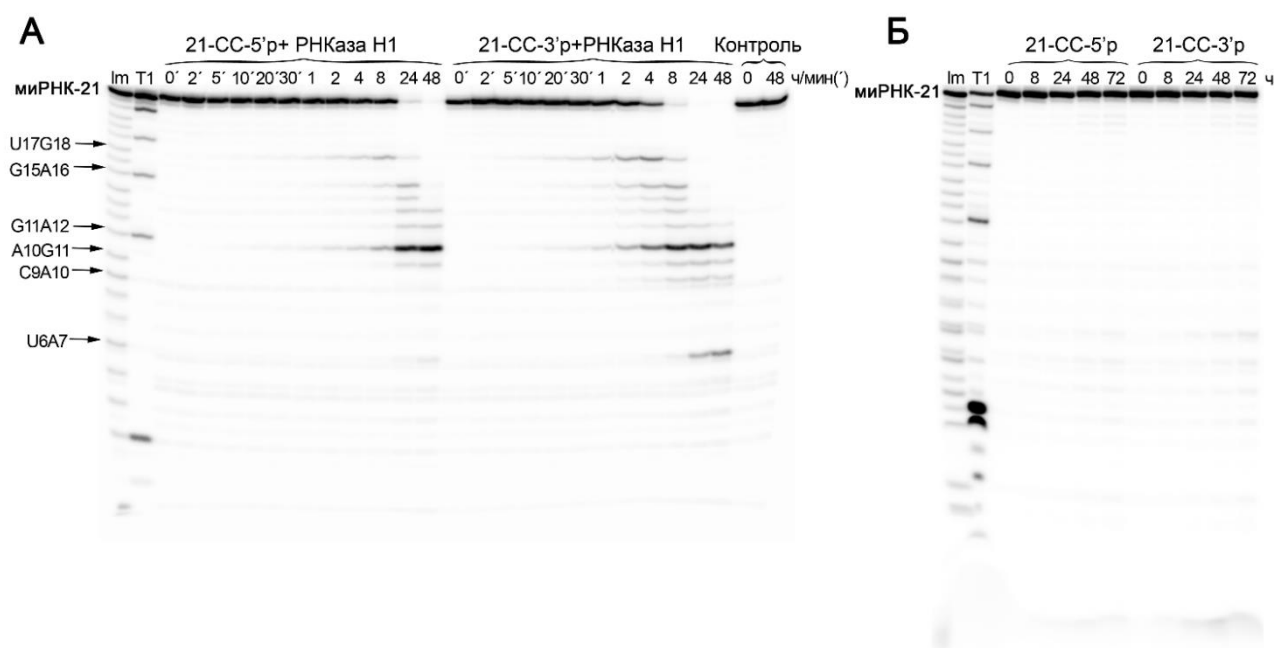


Рис. 32. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-21 крабоподобными моно-пептидными миРНКазы 21-СС-5'-р и 21-СС-3'-р в присутствии РНКазы Н1. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 миРНКазы 21-СС-3'-р и 21-СС-5'-р в присутствии РНКазы Н1 (**А**) и миРНКазы 21-СС-3'р и 21-СС-5'р (**Б**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-микроРНК (10 мкМ) и СС (5 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 48 ч. Концентрация РНКазы Н1 – 5 ед.акт./мл. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-миРНК-21 инкубировали в присутствии РНКазы Н и в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах).

3.4.4. Исследование эффективности расщепления микроРНК при совместном действии вилкоподобных миРНКаз и РНКазы Н1

Исследование эффективности расщепления миРНК-21 в условиях комбинированного применения вилкоподобных миРНКаз и РНКазы Н1 проводили с использованием 21-FC-βр в условиях многооборотной реакции (miRNA/FC=2/1- 10 мкМ/ 5 мкМ) в буфере II.

Так же, как и в случае крабоподобных миРНКаз, при использовании буфера II, содержащего MgCl₂, каталитическая активность вилкоподобных конструкций была значительно снижена. Эффективность расщепления миРНК-21 под действием 21-FC-βр сокращалась в 2 раза и составляла 19% через 24 ч (**Рис. 33**). Снижение эффективности расщепления вилкоподобных миРНКаз в магний-содержащем буфере, вероятно, объясняется стабилизацией гетеродуплекса и вторичной структуры миРНК и миРНКазы, что снижает эффективность диссоциации и препятствует циклическому взаимодействию.

При использовании РНКазы Н1 в концентрации 5 ед.акт./мл расщепление миРНК-21 в гетеродуплексе с олигонуклеотидом 21-F-ON было крайне низким и составляло не более 9% за 24 ч (**Рис. 33 А и Б**). Совместное действие вилкоподобной миРНКазы 21-FC-βр и РНКазы Н1 приводило к значительному увеличению эффективности расщепления и полная деградация

мишени в этих условиях достигалась уже за 8 ч. Паттерн расщепления микроРНК при совместном действии РНКазы Н1 и FC включал как гидролиз по сайтам, характерным для миРНКаз, U1-A2, G3-C4, U6-A7, так и по связям в области гетеродуплекса A7-U8, A10-G11, G11-A12, специфичным для РНКазы Н1 (**Рис. 33 В**).

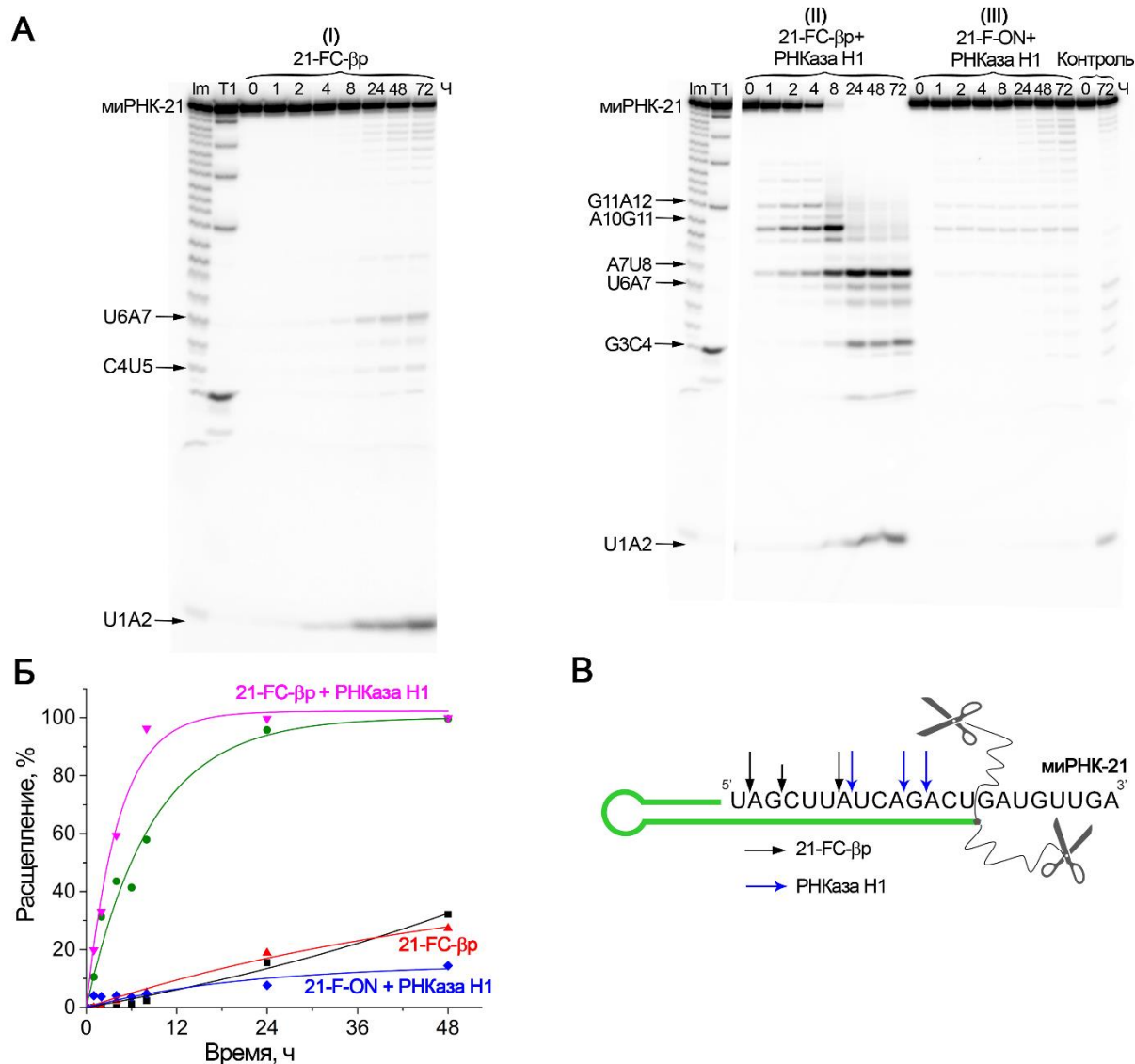


Рис.33. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-21 в комплексе с олигонуклеотидом 21-F-ON или вилокподобной миРНКазой 21-FC-βp в присутствии РНКазы Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 миРНКазой 21-FC-βp (**I**), комбинацией 21-FC-βp и РНКазы Н1 (**II**), РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 21-F-ON (**III**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-микроРНК (10 мкМ) и FC или F-ON (5 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 72 ч. Концентрация РНКазы Н1 – 5 ед.акт./мл. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[³²P]-миРНК-21 инкубировали в присутствии РНКазы Н и в отсутствие олигонуклеотида и миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК-21 миРНКазой 21-FC-βp и/или РНКазой Н1. **В** – основные сайты расщепления миРНК-21 при совместном действии вилокподобной миРНКазы 21-FC-βp (черные стрелки) и РНКазы Н1 (синие стрелки).

Ключевым механизмом антисмысловой технологии, направленной на подавление РНК в клеточных системах является селективное разрушение молекул РНК в составе гетеродуплексов ДНК/РНК под действием РНКазы Н1. Помимо собственной рибонуклеазной активности, миРНКазы способны рекрутировать внутриклеточную РНКазу Н1, что обеспечивает дополнительное расщепление микроРНК в области гетеродуплекса и значительно повышает эффективность её деградации. Экспериментальный анализ показал, что в условиях, близких к внутриклеточным все разработанные миРНКазы способны формировать гетеродуплексы с микроРНК-мишенями, обладающими субстратными свойствами по отношению к РНКазе Н1.

Важным результатом исследования является то, что под действием совместного применения миРНКаз и РНКазы Н1 эффективность деградации микроРНК-мишеней многократно возрастает по сравнению с действием только миРНКазы или РНКазы Н1 в гетеродуплексе с олигонуклеотидом. Таким образом, при сочетанном действии двух ферментов наблюдается синергический эффект и степень расщепления увеличивается от 3 до 120 раз в зависимости от типа миРНКазы, избытка микроРНК в реакции, концентрации РНКазы Н1 и последовательности мишени. Следует отметить, что наиболее выраженный синергический эффект наблюдался для менее активных вариантов миРНКаз: двойных и петлеобразующих миРНКаз. В частности, при совместном действии петлеобразующих моно-пептидных миРНКаз с РНКазой Н1 наблюдалось максимальное увеличение кратности расщепления – до 120 раз. Вероятно, более выраженный синергический эффект РНКазы Н1 с двойными и петлеобразующими конъюгатами по сравнению с вилкоподобными и крабоподобными конструкциями обусловлен формированием двух пространственно разделенных сайтов посадки для РНКазы Н1. Такая структурная организация способствует независимому рекрутированию молекул фермента к каждому из гетеродуплексных участков и последующей инициации кооперативного расщепления микроРНК одновременно в двух областях, что значительно усиливает общую каталитическую эффективность системы. Сравнительный анализ суммарной эффективности расщепления показал, что среди разработанных конструкций наибольший эффект в комбинации с РНКазой Н1 продемонстрировали крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы, обеспечивающие количественное расщепление мишени в условиях многооборотной реакции за 8 и 12 ч, соответственно. Высокая каталитическая эффективность определяется уникальным сочетанием структурных и каталитических свойств крабоподобных и вилкоподобных конструкций: способности к формированию более протяженных дуплексов с мишенью и высокой собственной ферментативной активностью, приводящих к максимально эффективной деградации субстрата.

Важным преимуществом разработанных конструкций является то, что при их сочетанном применении с РНКазой Н1 деградация микроРНК осуществляется по всей длине молекулы:

одноцепочечные области расщепляются миРНКазой, а области гетеродуплекса – РНКазой Н1. Такой механизм обеспечивает более надежную инактивацию микроРНК вследствие её полного разрушения.

Синергический эффект кооперативного действия миРНКазы и РНКазы Н1 может быть обусловлен рядом факторов: смещением каталитических пептидов в наиболее восприимчивые одноцепочечные участки РНК-мишени в результате связывания РНКазы Н1 с гетеродуплексом; электростатической стабилизацией дуплексной структуры посредством положительно заряженных пептидных фрагментов, усиливающих взаимодействие миРНКазы с РНК-субстратом; а также увеличением процессивности ферментативного процесса за счет формирования множества продуктов катализа, их облегченной диссоциации и эффективного вовлечения ферментов в следующие циклы реакции. Кроме того, недавние исследования показали, что некоторые белки способны связываться с РНКазой Н1 и усиливать её активность [93]. На этом основании можно предположить, что дополнительный вклад в наблюдаемый синергический эффект может вносить пептид в составе миРНКаз, способствующий потенцированию активности РНКазы Н1.

Таким образом, совместное использование миРНКаз и РНКазы Н1, вне сомнений, представляет собой перспективную стратегию для дальнейшего применения таких миРНК-направленных ингибиторов на линиях опухолевых клеток, поскольку сможет обеспечить эффективную инактивацию целевой микроРНК и способствовать блокированию патологических процессов.

3.5. Исследование устойчивости разработанных миРНКаз к действию внутриклеточных нуклеаз

Одним из ключевых параметров, определяющих продолжительность и стабильность действия терапевтических агентов в клетке, является их устойчивость к деградации под действием нуклеаз. Биологическую стабильность миРНКаз оценивали путем их инкубации в ростовой среде с 10% или 50%-ным содержанием бычьей эмбриональной сыворотки (БЭС). Такая концентрация БЭС является стандартной для культивирования клеток и проведения функциональных исследований. Согласно литературным данным, 10% FBS обладает нуклеазной активностью, эквивалентной или даже превышающей сыворотки взрослого человека [94].

Анализ нуклеазоустойчивости проводили для наиболее активных типов разработанных миРНКаз (крабоподобные и вилкоподобные), которые далее будут использоваться в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для определения биологической и противоопухолевой активности.

3.5.1. Исследование нуклеазоустойчивости крабоподобных миРНКаз

Структура крабоподобных миРНКаз, включающая каталитические пептиды, расположенные на концах распознающего домена, может обеспечивать защиту немодифицированного олигонуклеотида от экзонуклеазной деградации с 5'- и 3'-конца. Биологическую стабильность крабоподобных миРНКаз исследовали в среде с 10% БЭС на примере конъюгата Scr-CC- $\alpha\alpha$, имеющего структуру крабоподобной миРНКазы, но содержащий олигонуклеотидный компонент, который не имеет мишени в геноме млекопитающих. Электрофоретический анализ показал, что крабоподобная миРНКаза Scr-CC- $\alpha\alpha$ проявляла значительно более высокую нуклеазоустойчивость по сравнению с соответствующим олигонуклеотидом Scr-C-ON- $\alpha\alpha$, не содержащим каталитических пептидов. Через 72 ч инкубации приблизительно 15% CC оставалось в интактном состоянии, тогда как олигонуклеотид подвергался полной деградации в течение первых двух часов инкубации (**Рис. 34**). Период полужизни Scr-CC- $\alpha\alpha$ составил 4 ч, что в 8 раз превышает $t_{1/2}$ для немодифицированного олигонуклеотида (≈ 0.5 ч).

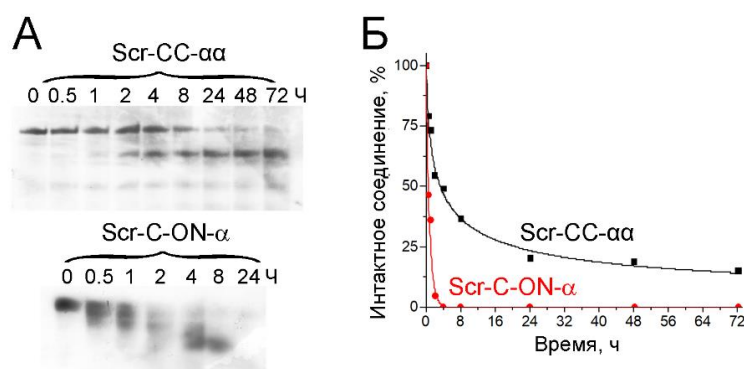


Рис. 34. Стабильность крабоподобного конъюгата Scr-CC- $\alpha\alpha$ и соответствующего олигонуклеотида Scr-C-ON- $\alpha\alpha$ в ростовой среде, содержащей 10%-ную БЭС. **А** – продукты деградации конъюгата Scr-CC- $\alpha\alpha$ и олигонуклеотида Scr-C-ON- $\alpha\alpha$ в 18%-ном денатурирующем ПААГ, окрашенным Stains-All. Над дорожками обозначено время инкубации соединения при 37 °C в среде с 10%-ной БЭС (в часах). **Б** – степень деградации соединений в зависимости от времени инкубации.

3.5.3. Исследование нуклеазоустойчивости вилкоподобных миРНКаз

В предыдущих исследованиях по исследованию нуклеазоустойчивости шпилечной миРНКазы, являющейся прототипом для вилкоподобных миРНКаз, было показано, что в среде с 10%-ной БЭС соединение остается интактным на 95% в течение 48 ч [47]. Поэтому для оценки устойчивости вилкоподобных миРНКаз к деградации нуклеазами была проанализирована стабильность неспецифичного конъюгата Scr-FC- $\beta\rho$ при инкубации в ростовой среде, содержащей 50%-ную БЭС (**Рис. 35**).

Анализ данных показал, что шпилечная структура на 3'-конце и два фланкирующих пептида на 5'-конце распознающего олигонуклеотида в структуре вилкоподобных миРНКаз обеспечивают высокую устойчивость к нуклеазам. Согласно электрофоретическому анализу,

структурная целостность конъюгата сохранялась до 8 ч при 37 °С (**Рис. 35**), а период полужизни составлял около 3 ч. Высокая нуклеазоустойчивость вилкоподобных миРНКаз может способствовать пролонгированному ингибирующему действию *in vivo*.

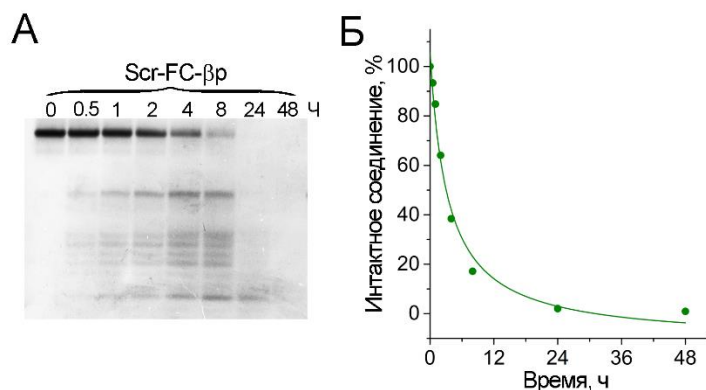


Рис. 35. Стабильность вилкоподобного конъюгата Scr-FC-βр в ростовой среде DMEM, содержащей 50%-ную БЭС. **А** – продукты деградации конъюгата Scr-FC-βр в 18%-ном денатурирующем ПААГ, окрашенным Stains-All. Над дорожками обозначено время инкубации соединения при 37 °С (в часах). **Б** – степень деградации соединений в зависимости от времени инкубации.

Таким образом, крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы демонстрируют высокую степень нуклеазоустойчивости, сопоставимую с химически модифицированными анти-микроРНК олигонуклеотидами, широко применяемыми в трансляционных исследованиях [79]. В частности, разработанные крабоподобные миРНКазы, превосходят по стабильности ДНК/LNA и 2'ОМе/LNA миксмеры, которые полностью деградируют в течение 6 ч в присутствии 10%-ной сыворотки, и проявляют сравнимую нуклеазоустойчивость с ДНК-, LNA- и ДНК/LNA-миксмерами, защищенными дополнительными тремя фосфотиоатными модификациями по 5'- и 3'-концам [79].

Полученные результаты показывают, что введение в структуру миРНКаз, содержащих немодифицированный распознающий домен, концевых пептидов и шпилечных структур позволяет достичь устойчивости к нуклеазам, достаточной для осуществления терапевтического эффекта соединений в условиях клетки и *in vivo*.

3.6. Исследование биологической активности и терапевтического потенциала миРНКаз на опухолевых моделях *in vitro* и *in vivo*.

Исследование биологической активности и терапевтического потенциала проводилось для крабоподобных и вилкоподобных миРНКаз, которые характеризовались наиболее высокой рибонуклеазной активностью и высоким уровнем синергии с РНКазой Н1. Исследование биологического действия миРНКаз включало оценку степени подавления микроРНК-мишеней, а также определение антипролиферативной и антимиграционной активности на различных линиях опухолевых клеток. На мышинных моделях был изучен терапевтический эффект выбранных

миРНКаз, включая способность подавлять опухолевый рост, влиять на пролиферативную и апоптотическую активность опухолевой ткани.

3.6.1. Исследование биологической активности крабоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток *in vitro*

МикроРНК отличаются от других типов внутриклеточных РНК высокой концентрацией, биологической стабильностью и длительным временем полужизни [50,95]. МиРНК-21 является одной из наиболее представленных микроРНК в эукариотических клетках, особенно при неопластической трансформации, когда её уровень дополнительно возрастает. В зависимости от условий, внутриклеточная концентрация миРНК-21 может варьировать от 0.5 до 22 мкМ [95,96].

С учетом высокого внутриклеточного содержания микроРНК для экспериментов на клеточных культурах была использована концентрация крабоподобных миРНКаз 1 мкМ. Данная концентрация соединений не позволяет достичь стехиометрического соотношения с микроРНК, однако предполагается, что многооборотный режим действия миРНКазы и синергия с РНКазой Н1 позволят достичь значимого ингибирующего эффекта. В качестве доставляющего агента для трансфекции крабоподобных миРНКаз в клетки использовали коммерческий агент Lipofectamine™ 2000.

Для оценки биологической активности миРНКаз в качестве контрольного соединения в клеточных экспериментах использовали неспецифический крабоподобный конъюгат Scr-СС-αα (Таблица 2). В экспериментах с синтетическими 5'-[³²P]-миРНК-21 или 5'-[³²P]-миРНК-17 было установлено, что контрольный конъюгат Scr-СС-αα проявляет низкую рибонуклеазную активность. При инкубации контрольного конъюгата с микроРНК в буфере I при молярном соотношении микроРНК/миРНКазы = 1/5 степень расщепления составляла 14% для миРНК-21 и 9% для миРНК-17 через 24 ч (Рис. 36). Поскольку функционально активные РНК в клетке преимущественно находятся в составе рибонуклеопротеиновых комплексов, их ингибирование возможно только при условии прямого включения рибонуклеазы в такой комплекс, что обеспечивается сиквенс-специфическим взаимодействием ингибитора с РНК-мишенью, образованием предполагаемого гетеродуплекса и рекрутинга эндогенной РНКазы Н1. Поскольку контрольный конъюгат Scr-СС-αα проявлял низкую рибонуклеазную активность, а также не способен специфически связываться с РНК в клетке, можно предположить, что его применение на клеточных культурах не приведет к неспецифическим эффектам.

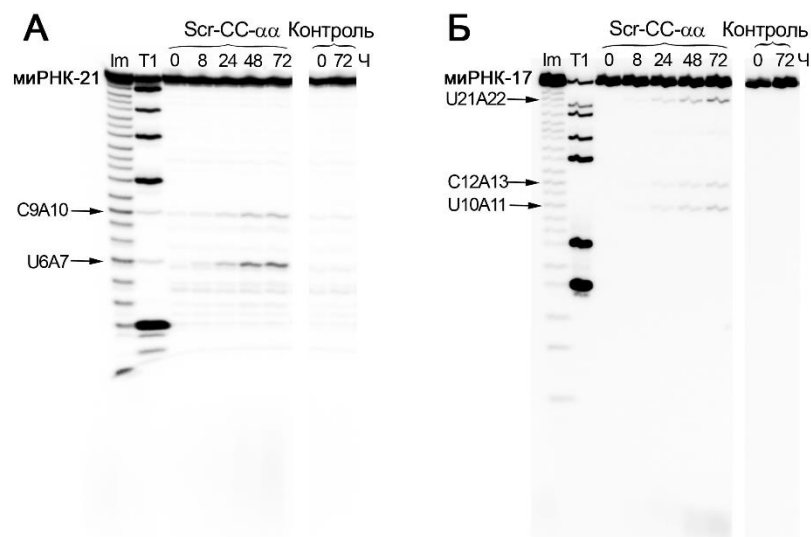


Рис. 36. Расщепление синтетических 5'-[^{32}P]-миРНК-21 и 5'-[^{32}P]-миРНК-17 под действием контрольного крабоподобного конъюгата Scr-CC- $\alpha\alpha$. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 (**А**) и миРНК-17 конъюгатом Scr-CC- $\alpha\alpha$. 5'-[^{32}P]-микроРНК (1 мкМ) и Scr-CC- $\alpha\alpha$ (5 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[^{32}P]-микроРНК инкубировали в отсутствие конъюгата. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах).

Для оценки способности крабоподобных миРНКаз снижать уровень микроРНК-мишеней в клетках использовали линию аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, которая характеризуется высокой экспрессией миРНК-21 и миРНК-17. Ингибирующую активность специфических крабоподобных миРНКаз 21-CC- $\alpha\alpha$, 21-CC- $\beta\beta$, 21-CC- $\rho\rho$, 17-CC- $\alpha\alpha$ сравнивали как с действием неспецифического конъюгата Scr-CC- $\alpha\alpha$, так и с соответствующими антисмысловыми олигонуклеотидами 21-C-ON или 17-C-ON, не содержащими каталитических пептидов (**Рис. 37 А и Б**). Согласно данным ПЦР анализа, контрольное соединение Scr-CC- $\alpha\alpha$ не влияло на уровень миРНК-21 и миРНК-17 в клетках MCF-7. Анализ кинетики подавления микроРНК показал, что применение комплементарных олигонуклеотидов и крабоподобных миРНКаз приводило к снижению уровня мишеней с максимальным эффектом, достигаемым к 24 ч после трансфекции (**Рис. 37 А и Б**). При этом миРНКазы демонстрировали более выраженное ингибирующее действие, чем олигонуклеотиды. Анализ показал, что степень снижения миРНК-21 и миРНК-17 под действием специфических олигонуклеотидов составляла 30-40% (**Рис. 37 А и Б**). Среди миРНК-21-направленных крабоподобных миРНКаз, наибольший ингибирующий эффект продемонстрировал 21-CC- $\rho\rho$, который приводил к снижению уровня миРНК-21 на 65% (**Рис. 37 А**). К 48 ч уровень миРНК-21 восстанавливался до 50 % и оставался стабильным до 72 ч. 21-CC- $\alpha\alpha$ приводил к 55%-ному подавлению миРНК-21, а наименьший эффект продемонстрировал 21-CC- $\beta\beta$, под действием которого уровень миРНК-21 снижался на 30% через 24 ч, что сопоставимо с действием антисмыслового олигонуклеотида 21-C-ON (**Рис. 37 А**).

миРНК-17-направленная миРНКаза 17-СС-αα вызывала выраженное снижение уровня миРНК-17, достигающее 58% (**Рис. 37 Б**). Таким образом, крабоподобные миРНКазы способны эффективно подавлять миРНК-мишени, при этом их ингибирующее действие превосходит эффект соответствующих антисмысловых олигонуклеотидов. Кроме того, анализ биологической активности миРНК-21-направленных миРНКаз выявил прямую корреляционную зависимость между каталитической активностью соединений и степенью их микроРНК-ингибирующего эффекта. Наиболее каталитически активная миРНКаза 21-СС-pp в исследуемой серии, индуцировала максимальное снижение уровня мишени.

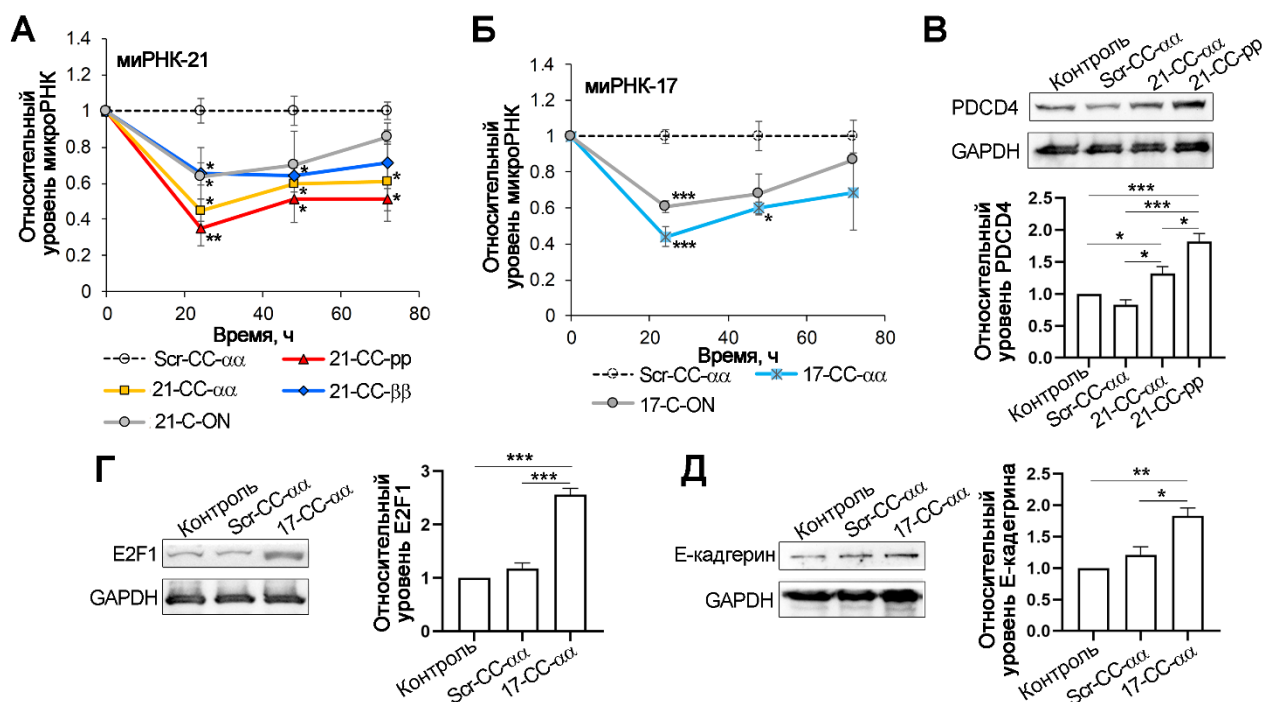


Рис. 37. Биологическая активность крабоподобных миРНКаз в опухолевых клетках. **А, Б** – кинетика снижения уровня миРНК-21 в клетках MCF-7 под действием крабоподобных миРНКаз 21-СС-pp, 21-СС-αα и 21-СС-ββ и олигонуклеотида 21-С-ON (**А**), и снижение уровня миРНК-17 под действием 17-СС-αα и 17-С-ON (**Б**). Относительные уровни миРНК-21 и миРНК-17 были получены с помощью метода stem-loop ПЦР. Эффективность специфических миРНКаз сравнивалась с контрольным неспецифическим конъюгатом Scr-CC-αα. Уровень микроРНК нормировали на уровень микроРНК U6. *, ** и *** – статистически значимые отличия от контрольного конъюгата Scr-CC-αα с $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$, соответственно. **В, Г, Д** – уровни белков PDCD4 (**В**), E2F1 (**Г**) и E-кадгерина (**Д**), определенные методом вестерн блот гибридизации через 72 ч после трансфекции клеток MCF-7 крабоподобными миРНКазми 21-СС-αα, 21-СС-pp (**В**) и 17-СС-αα (**Г, Д**). Уровни белков нормировали на уровень белка GAPDH. *, ** и *** – статистически значимые отличия с $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$.

Специфичность подавления экспрессии микроРНК под действием миРНКаз дополнительно оценивали посредством анализа уровня некомплементарной микроРНК let-7g. Анализ показал, что миРНК-21- и миРНК-17-направленные крабоподобные миРНКазы одновременно со значительным снижением уровней комплементарных мишеней (**Рис. 37 А и Б**),

не оказывали влияния на уровень let-7g через 24 ч после трансфекции (**Рис. 38**), что подтверждает сиквенс-специфичность разработанных ингибиторов микроРНК.

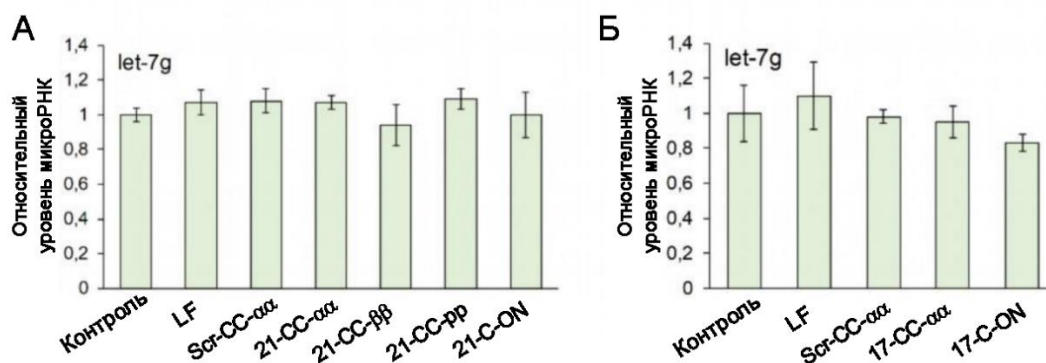


Рис. 38. Уровень микроРНК let7-g в клетках MCF-7 через 24 ч после трансфекции миРНК-21-направленными крабоподобными миРНКазми 21-CC-α, 21-CC-β, 21-CC-pp и олигонуклеотидом 21-C-ON (**А**), и миРНК-17-направленной миРНКазой 17-CC-α и олигонуклеотидом 17-C-ON (**Б**). Трансфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine™ 2000 при концентрации соединений 1 мкМ. Относительный уровень РНК определяли методом stem-loop ПЦР в режиме реального времени. Контроль – интактные клетки. LF – клетки, инкубированные только с Lipofectamine™ 2000. Уровень микроРНК нормировали на уровень мяРНК U6.

Одновременно с этим специфичность действия крабоподобных миРНКаз была подтверждена путём анализа изменения уровней белков, напрямую регулируемых миРНК-21 и миРНК-17. Подавление миРНК-21 под действием 21-CC-α и 21-CC-pp в клетках MCF-7 приводило к увеличению уровня белка-супрессора опухолей PDCD4 (от англ. programmed cell death 4) [97] в 1.35 и 1.7 раз, соответственно (**Рис. 37 В**). Аналогично, ингибирование миРНК-17 приводило к увеличению уровня белка E2F1 [98] в 1.9 раз и белка клеточной адгезии Е-кадгерина [99] в 1.5 раза в клетках MCF-7 (**Рис. 37 Г и Д**). Эти результаты дополнительно подтверждают специфичность действия разработанных ингибиторов микроРНК.

Повышенный уровень миРНК-21 и миРНК-17 напрямую связан с ключевыми процессами опухолевого роста, такими как неконтролируемая пролиферация, ингибирование апоптоза, повышенная миграция и инвазия [100–102]. В связи с этим, специфическое ингибирование миРНК-21 и миРНК-17 потенциально может приводить к снижению пролиферации опухолевых клеток. Влияние миРНК-21-направленных крабоподобных миРНКаз на пролиферацию клеток оценивали на культурах аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, карциномы лёгких А-549 и меланомы мыши В16 с использованием WST-анализа.

Оценка жизнеспособности клеток посредством WST-анализа выявила вариабельность эффекта крабоподобных миРНКаз в зависимости от типа опухолевых клеток. Наибольшую чувствительность к антиролиферативному действию продемонстрировали клетки MCF-7 и А-549: миРНКазы вызывали снижение пролиферативной активности клеток MCF-7 на 30–35 %, (**Рис. 39 А**), а клеток А-549 на 50% через 48 ч (**Рис. 39 А**). Вместе с этим, крабоподобные

миРНКазы не вызвали достоверного изменения пролиферации клеток линии В16 (Рис. 39 А). Различная чувствительность опухолевых клеток к действию миРНКаз может быть связана с разницей в исходной скорости пролиферации клеточной линии, а также с особенностями внутриклеточной локализации и транспорта миРНКаз в различных типах клеток.

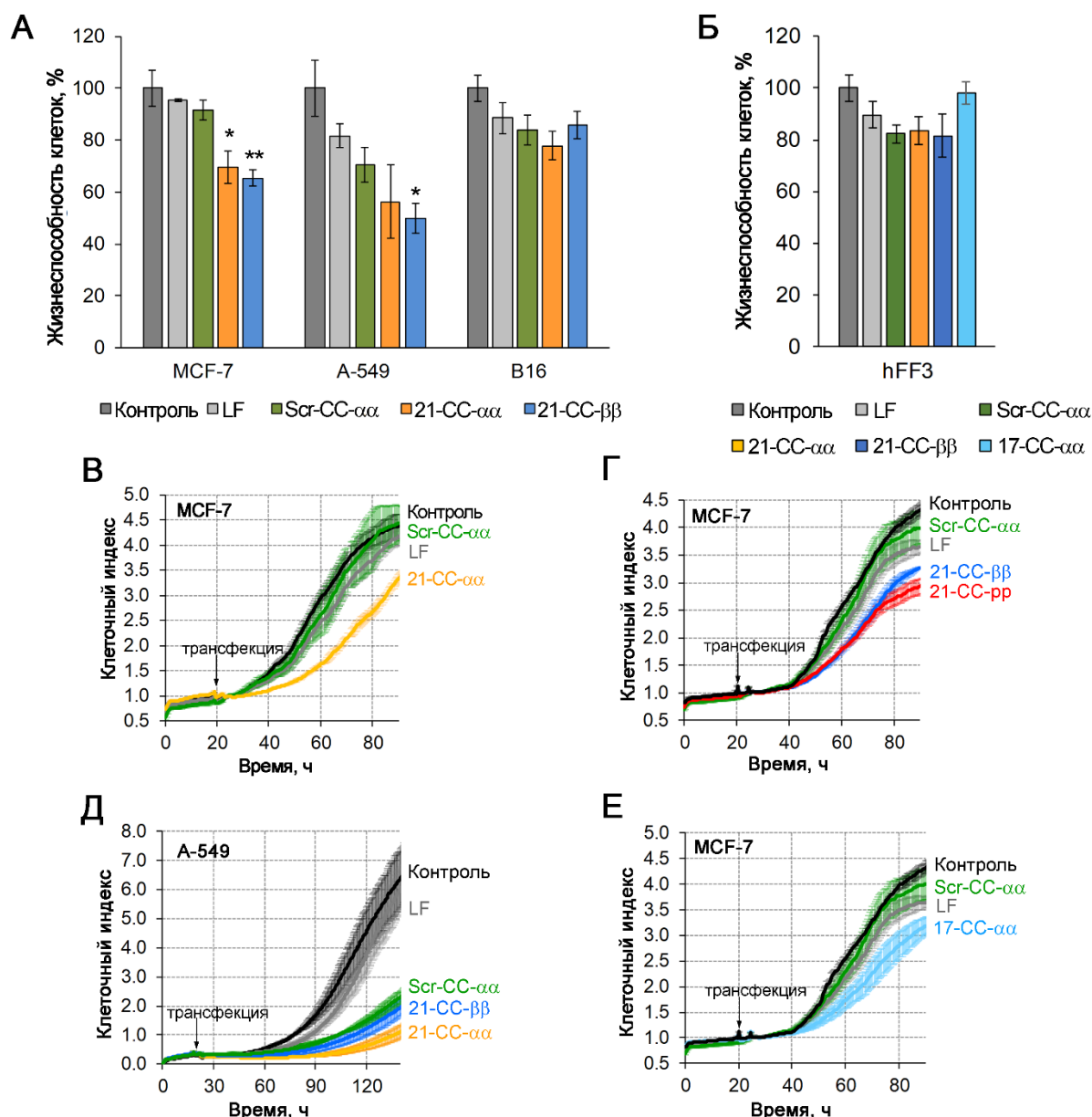


Рис. 39. Антипролиферативная активность крабоподобных миРНКаз. **А** – жизнеспособность опухолевых клеток MCF-7, A-549 и B16 после трансфекции миРНКазами 21-CC-αα и 21-CC-ββ. **Б** – жизнеспособность нормальных клеток фибробластов человека hFF3 после трансфекции миРНКазами 21-CC-αα, 21-CC-ββ и 17-CC-αα. WST-анализ проводился через 72 ч после трансфекции крабоподобными миРНКазами. * и ** - статистически значимые отличия от Scr-CC-αα с $p \leq 0.05$ и $p \leq 0.01$. **В, Г, Д, Е** – пролиферативная активность клеток MCF-7 (**В, Г, Е**) и A-549 (**Д**) после трансфекции миРНК-21-направленными миРНКазами 21-CC-αα, 21-CC-ββ и 21-CC-pp (**В – Д**) или миРНК-17-направленной миРНКазой 17-CC-αα (**Е**). Пролиферативную активность клеток определяли с помощью системы анализа в реальном времени xCelligence после трансфекции миРНКазами. Контроль – интактные клетки. LF – клетки, инкубированные только

с Lipofectamine™ 2000. Трансфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine™ 2000 при концентрации соединений 1 мкМ.

Исследование влияния крабоподобных миРНКаз на жизнеспособность нормальных клеток показало, что соединения не оказывают значимого эффекта на пролиферацию нетрансформированных клеток фибробластов человека линии hFF3 (**Рис. 39 Б**), что согласуется с литературными данными о селективности анти-миРНК-21 терапии по отношению к опухолевым клеткам [103].

Антипролиферативное действие крабоподобных миРНКаз в клетках MCF-7 и A-549, выявленное WST-анализом, было дополнительно подтверждено методом анализа клеток в реальном времени с помощью системы xCELLigence. 21-CC- $\alpha\alpha$, 21-CC- $\beta\beta$ и 21-CC-pp вызывали замедление роста опухолевых клеток MCF-7 на 45–55 % (**Рис. 39 В и Г**). Антипролиферативное действие миРНКаз 21-CC- $\alpha\alpha$ и 21-CC- $\beta\beta$ на клетках A-549 было ещё более выраженным: подавление клеточного роста достигало 85 % (**Рис. 39 Д**). Однако контрольный конъюгат Scr-CC- $\alpha\alpha$ также проявлял значимый антипролиферативный эффект на клетках A-549 (**Рис. 39 Д**), что указывает на повышенную чувствительность этой линии клеток к воздействию. МиРНК-17-направленная миРНКаза Crab- α -17 эффективно подавляла пролиферацию клеток MCF-7, снижая скорость клеточного роста на 40 % (**Рис. 39 Е**).

Результаты исследований подтверждают терапевтический потенциал крабоподобных миРНКаз в качестве селективных модуляторов онкогенных микроРНК, способных нарушать функционирование ключевых сигнальных каскадов и ослаблять малигнизированный фенотип опухолевых клеток.

3.6.2. Исследование биологической активности вилкоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток *in vitro*

Высокая эффективность расщепления микроРНК по действию вилкоподобных миРНКаз в условиях присутствия РНКазы Н1 послужила основанием для исследования их биологической активности и терапевтического потенциала. Биологическую эффективность миРНК-21-направленной миРНКазы 21-FC- $\beta\beta$ оценивали по способности снижать пролиферативную и миграционную активность опухолевых клеток.

На первом этапе было проведено исследование дозозависимого подавления миРНК-21 при трансфекции клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 миРНКазой 21-FC- $\beta\beta$ в диапазоне концентраций 10-200 нМ (**Рис. 40 А**). Эффект специфической миРНКазы сравнивался с действием контрольного конъюгата Scr-FC- $\beta\beta$. В ходе анализа было установлено, что специфическое снижение пролиферации клеток проявлялось уже при концентрациях миРНКазы 10-25 нМ и достигало максимума при 50 нМ, при этом жизнеспособность клеток снижалась на 60% за 72 ч (**Рис. 40 А**). В этих концентрациях миРНКазы демонстрировала активность,

превышающую действие шпилечного олигонуклеотида 21-F-ON в 1.5-2 раза. При увеличении концентраций до 100 и 200 нМ различия между специфической и контрольной миРНКазой нивелировались (Рис. 40 А).

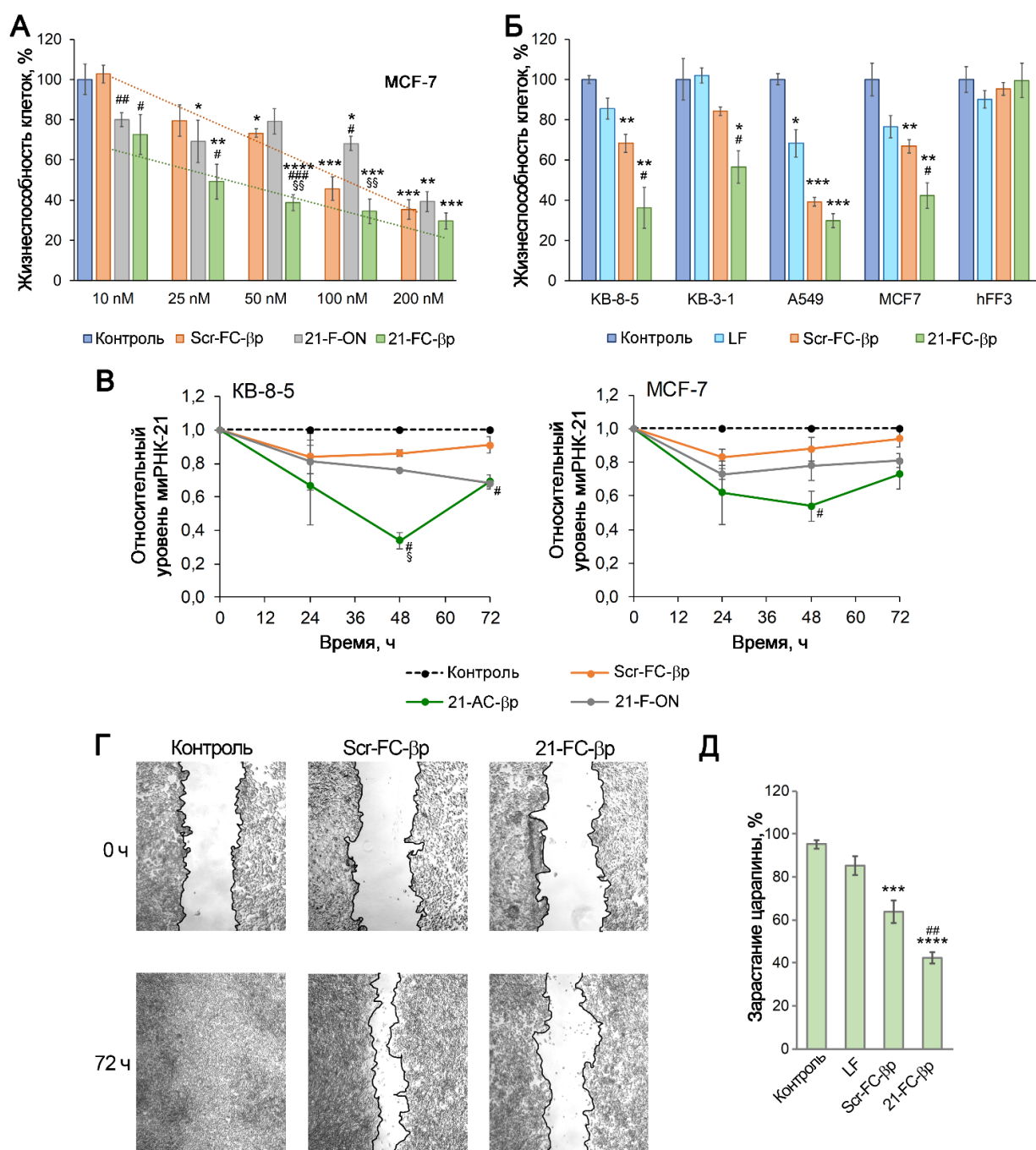


Рис. 40. Биологическая активность вилкоподобных миРНКаз в опухолевых клетках. **А** – пролиферативная активность клеток MCF-7 после трансфекции миРНКазой 21-FC-βp и миРНК-21-направленным олигонуклеотидом 21-F-ON в различных концентрациях. МТТ-тест проводили через 72 ч после трансфекции миРНКазой/ОН в диапазоне концентраций 10 – 200 нМ в комплексе с Lipofectamine™ 2000. **Б** – пролиферативная активность опухолевых клеток KB-8-5, KB-3-1, A549, MCF7 и нормальных фибробластов hFF3A под действием 21-FC-βp. МТТ-тест проводили через 48 ч после трансфекции 21-FC-βp в концентрации 50 нМ в комплексе с Lipofectamine™ 2000. **В** – кинетика снижения уровня миРНК-21 в клетках KB-8-5 и MCF-7 под действием миРНКазы 21-FC-βp в концентрации 50 нМ. Уровни миРНК-21 получены методом stem-loop

ПЦР. Эффективность специфической миРНКазы сравнивали с неспецифическим конъюгатом Scr-FC-βр. Уровень микроРНК нормировали на уровень мяРНК U6. Г – миграционная активность клеток KB-8-5 под действием 21-FC-βр. Анализ scratch теста проводили через 72 ч после нанесения «царапины» и через 96 ч после трансфекции 21-FC-βр или Scr-FC-βр в комплексе с Lipofectamine™ 2000. Увеличение $\times 10$. Черными линиями обозначены границы царапины. Д – Степень застания царапины через 72 ч после нанесения царапины. *, **, *** и **** – статистически значимые отличия от контроля с $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ и $p \leq 0.0001$. #, ## и ### – статистически значимые отличия от контрольного конъюгата Scr-FC-βр с $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$. § и §§ – статистически значимые отличия от 21-F-ON с $p \leq 0.05$ и $p \leq 0.01$. Контроль – интактные клетки; LF – клетки, инкубированные только с Lipofectamine™ 2000.

Для выявления клеточных линий, проявляющих наибольшую чувствительность к действию вилкоподобных миРНКаз, был проведён скрининг ряда культур, включая клетки эпидермоидной карциномы (KB-8-5, KB-3-1), меланомы (B16), аденокарциномы лёгкого (A-549), аденокарциномы молочной железы (MCF-7), а также клетки нормальных фибробластов кожи человека (hFF3). Трансфекция клеток миРНКазой 21-FC-βр приводила к выраженному снижению жизнеспособности и пролиферации клеток KB-8-5, KB-3-1, MCF-7 и A-549, составляющему 45–70%, при этом наибольшую чувствительность продемонстрировали линии KB-8-5 и A-549 (**Рис. 40 Б**). Следует отметить, что клетки A-549 проявляли значительную чувствительность и к действию контрольного конъюгата. При выраженном антипролиферативном действии в отношении опухолевых клеток, при трансфекции 21-FC-βр в нетрансформированные фибробласты hFF3 существенных изменений жизнеспособности или пролиферации клеток не наблюдалось (**Рис. 40 Б**).

Методом ПЦР было подтверждено, что антипролиферативный эффект вилкоподобной миРНКазы 21-FC-βр ассоциирован с подавлением экспрессии миРНК-21 (**Рис. 40 В**). В клетках KB-8-5 уровень миРНК-21 снижался на 60% через 48 ч после трансфекции миРНКазой, а в клетках MCF-7 подавление составило 40% через 24 ч, при этом эффект сохранялся в течение 48 ч. К 72 ч уровень миРНК-21 в обеих клеточных линиях восстанавливался до 80% (**Рис. 40 В**). Для сравнения, миРНК-21-направленный олигонуклеотид 21-F-ON также вызывал подавление уровня микроРНК-мишени, но с более низкой эффективностью, приводя к 35%-ному снижению уровня миРНК-21 (**Рис. 40 В**).

Известно, что миРНК-21 также играет ключевую роль в стимуляции процессов инвазии и миграции клеток, способствуя метастазированию и прогрессии неопластических заболеваний [104–106]. В рамках данного исследования были проанализированы антимиграционные свойства вилкоподобной миРНКазы 21-FC-βр (**Рис. 40 Г и Д**). Результаты scratch теста на клетках эпидермоидной карциномы KB-8-5 показали, что контрольное соединение Scr-FC-βр снижало миграцию клеток на 35% через 72 ч за счёт неспецифического действия. При этом миРНК-21-направленная миРНКaza демонстрировала в 1.5–2 раза более выраженный ингибирующий эффект (**Рис. 40 Г и Д**). Полученные результаты согласуются с данными предшесствующих

исследований антимиграционной активности шпилечных миРНКаз на модели клеток KB-8-5 [107].

Проведенные исследования биологической активности показали, что разработанные крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы обеспечивают эффективное и селективное подавление онкогенных микроРНК, результатом которого является значительное снижение пролиферативных и миграционных процессов в опухолевых клетках *in vitro*. Ключевым фактором, обуславливающим высокую эффективность миРНКаз является каталитическая природа их действия: по сравнению с олигонуклеотидами, не содержащими пептидный домен, миРНКазы способствовали более выраженному подавлению уровней микроРНК, что сопровождалось антипролиферативным и антимиграционным эффектами.

Ингибирующие свойства разработанных миРНКаз сопоставимы или превосходят существующие технологии микроРНК-направленной терапии. Так, эффективность миРНКаз сравнима или даже превосходит эффективность недавно разработанных химерных конструкций, состоящих из миРНК-направленного антисмыслового олигонуклеотида, РНКазы L-рекрутирующего мотива и адресующего аптамера, которые снижали жизнеспособность клеток рака молочной железы на 33-50% [108]. Миграционная активность миРНКаз сопоставима по эффекту с действием РМО-анти-микроРНК олигонуклеотидов, которые вызывают 45-65%-ное подавление клеточной мотильности на модели колоректального рака [109]. Кроме того, миРНКазы демонстрируют сопоставимые эффекты с коммерческими ингибиторами микроРНК, например, продуктом компании GenePharma, способствующим подавлению пролиферации клеток рака поджелудочной железы на 50% [110].

Важной характеристикой миРНКаз является высокая селективность их действия: разработанные соединения эффективно подавляют экспрессию микроРНК-мишеней (миРНК-21 и миРНК-17), не влияя на уровни других микроРНК, а также вызывают антипролиферативный эффект преимущественно в опухолевых клетках, не оказывая значимого воздействия на жизнеспособность нормальных клеточных культур. Селективность анти-миРНК-21 терапии в опухолевых клетках подтверждается и литературными данными [103]. Так, экспрессия специфической анти-миРНК-21 лентивирусной конструкции в нормальных эпителиальных клетках молочной железы сопровождалась 60%-ным снижением микроРНК при сохранении нормальных характеристик клеточного цикла, адгезии и чувствительности к радиотерапии, тогда как в опухолевых клетках MDA-MB-361 проявлялась в виде выраженных функциональных эффектов [Radulovic и др., 2017].

Несмотря на характерную для микроРНК высокую внутриклеточную концентрацию и стабильность по сравнению с другими типами РНК [50,95], разработанные миРНКазы

демонстрируют способность к эффективному снижению уровней микроРНК-мишеней при концентрациях, существенно уступающих средним физиологическим значениям, характерным для микроРНК (0.5-22 мкМ). Высокая эффективность обусловлена способностью миРНКаз к многооборотному катализу и синергетическому взаимодействию с эндогенной РНКазой H1. В частности, крабоподобные миРНКазы проявляли выраженную биологическую активность при концентрации 1 мкМ, тогда как вилкоподобные конструкции демонстрировали эффективность и при концентрации 50 нМ, что свидетельствует об их исключительной каталитической способности и открывает перспективы для разработки высокоэффективных терапевтических агентов.

3.6.3. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.

Способность крабоподобных миРНКаз ингибировать рост опухоли была исследована на ксенографтной модели аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 у мышей. Дополнительной целью эксперимента являлось выявление возможной корреляции между рибонуклеазной активностью крабоподобных миРНКаз различной структуры, степенью подавления микроРНК и противоопухолевым эффектом.

Для проведения исследования было выбрано две миРНКазы: 21-СС-pp, обладающая высокой каталитической активностью, и 21-СС-aa, проявляющая более низкую эффективность *in vitro*. Для оценки непосредственного противоопухолевого эффекта и минимизации влияния ограничений, связанных с недостаточно эффективной доставкой соединений *in vivo*, применяли упрощённую экспериментальную схему без прямого введения миРНКаз в организм. Опухолевые клетки MCF-7 трансфицировали миРНКазами в комплексе с Lipofectamine™ 2000 в условиях *in vitro*, а затем имплантировали иммунодефицитным мышам линии nude для дальнейшей оценки динамики роста опухоли. Противоопухолевую активность специфических крабоподобных миРНКаз анализировали в сравнении с контрольными группами, в которых мышам вводили интактные клетки MCF-7 или клетки, обработанные неспецифическим конъюгатом Scr-СС-aa. Анализ кинетики роста опухоли (**Рис. 41 А и Б**) показал, что 21-СС-pp проявляет наиболее выраженное ингибирующее действие, снижая рост опухоли на 85 % по сравнению с группой Scr-СС-aa. миРНКазы 21-СС-aa, обладающая более низкой каталитической активностью, также демонстрировала достоверное снижение роста опухоли, однако эффект был ниже и составлял 50 % по сравнению со Scr-СС-aa. Полученные данные подтверждают наличие прямой зависимости между рибонуклеазной активностью крабоподобных миРНКаз и степенью их противоопухолевого действия. Дальнейший гистологический анализ для определения

пролиферативной и апоптотической активности опухолевых тканей был сфокусирован на наиболее эффективном соединении 21-CC-pp.

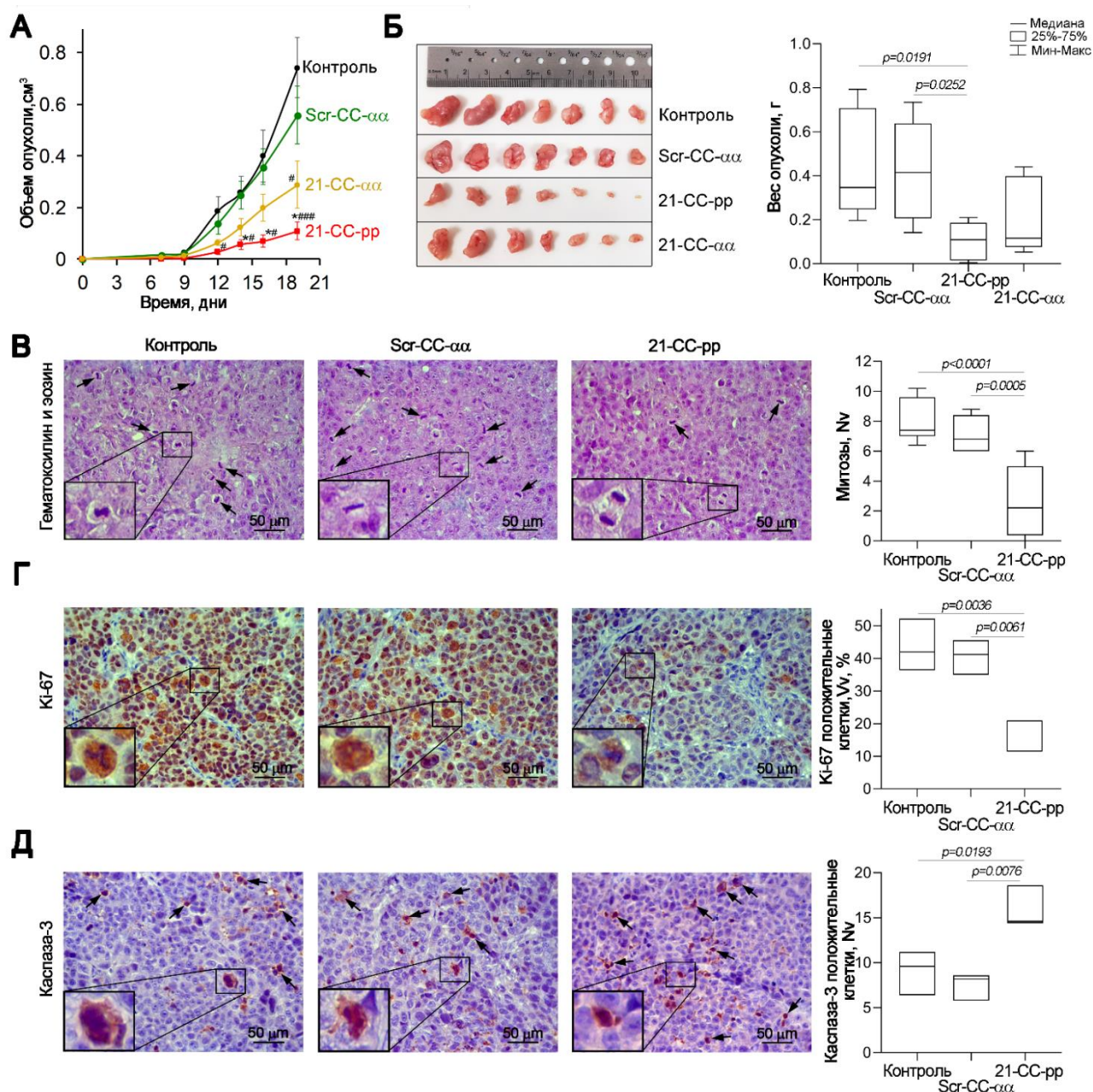


Рис. 41. Противоопухолевое действие миРНК-21-направленных крабоподобных миРНКаз на модели аденокарциномы молочной железы МСF-7. Клетки МСF-7 трансфицировали *in vitro* крабоподобными миРНКазами 21-CC-pp, 21-CC-αα и контрольным конъюгатом Scr-CC-αα в концентрации 1 мкМ с помощью Lipofectamine™ 2000, после чего клетки подкожно имплантировали мышам линии nude ($n = 7$). **А** – динамика роста опухоли МСF-7. Контроль – мыши, которым вводили интактные клетки МСF-7. * – статистически значимые отличия от группы Scr-CC-αα при $p \leq 0.05$. # и ### – статистически значимые отличия от группы контроля при $p \leq 0.05$ и $p \leq 0.001$, соответственно. **Б** – масса опухоли на 19-й день после имплантации. **В** – демонстрационные изображения срезов опухоли после окрашивания гематоксилином и эозином. Митотические события обозначены стрелками. В левом нижнем углу представлены примеры митотических событий. **Г, Д** – демонстрационные изображения срезов опухолей после иммуногистохимического окрашивания с использованием первичных антител к Ki-67 (**Г**) и каспазе-3 (**Д**). В левом нижнем углу показаны примеры Ki-67- и каспаза-3-положительных

клеток. Правые панели Г и Д содержат графики количественной оценки Ki-67- и каспаза-3-положительных клеток. Увеличение $\times 400$. Шкала соответствует масштабу 50 мкм. N_v – численная плотность, соответствующая числу частиц на единицу объема опухоли. V_v (%) – объемная плотность, отражающая объемную долю ткани, занятую данным компартментом.

Исследование влияния крабоподобных миРНКаз на морфофункциональные параметры опухолевых тканей оценивали с помощью гистологического и морфометрического анализа. Анализ гистологических препаратов опухолей с окраской гематоксилином и эозином показал, что под действием 21-СС-pp митотическая активность опухоли MCF-7 значительно снижалась, приводя к трехкратному снижению численной плотности митозов по сравнению с группой Scr-СС-aa (Рис. 41 В). Литературные данные указывают на положительную корреляцию между экспрессией миРНК-21 и уровнем белка Ki-67, который является широко используемым маркером пролиферации [111]. Иммуногистохимическое окрашивание ксенографтных опухолей MCF-7 с использованием Ki-67-специфичных антител показало, что в контрольной и Scr-СС-aa группах около 40 % опухолевых клеток характеризовались положительной экспрессией данного маркера (Рис. 41 Г). В группе, обработанной миРНКазой 21-СС-pp, число Ki-67-положительных клеток снижалось до 12 %, что соответствует более чем трехкратному снижению пролиферативной активности опухолевых клеток *in vivo* (Рис. 41 Г). Таким образом, антипролиферативный эффект крабоподобных миРНКаз, ранее выявленный в экспериментах на клеточных культурах, воспроизводится и на опухолевой модели у мышей.

Известно, что миРНК-21 участвует в негативной регуляции каспаза-3-зависимого апоптотического пути [100]. Морфометрический анализ иммуногистохимических срезов, окрашенных специфическими антителами к каспазе-3, показал низкий уровень апоптотической активности в опухолевой ткани контрольной и Scr-СС-aa групп (Рис. 41 Д). В группе, обработанной специфической миРНКазой 21-СС-pp, наблюдалось 1.5-кратное увеличение количества каспаза-3-положительных клеток, что свидетельствует об активации апоптотических процессов в опухолевой ткани в ответ на специфическое подавление миРНК-21 (Рис. 41 Д). Таким образом, направленное снижение уровня миРНК-21 в опухолевых клетках с помощью крабоподобных миРНКаз способствует не только подавлению пролиферации, но и индукции апоптоза, что в совокупности приводит к замедлению опухолевого роста у мышей.

3.6.4. Исследование противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.

На основании высокой каталитической активности, выраженного ингибирующего действия на культурах клеток и высокой нуклеазоустойчивости вилкоподобных миРНКаз, была проведена оценка их терапевтического потенциала *in vivo*. Противоопухолевый потенциал 21-FC-pp был исследован на ксенографтной модели эпидермоидной аденокарциномы человека KB-

8-5. Исследование проводили при прямом введении миРНКазы мышам. В качестве системы доставки использовали фолат-содержащие катионные липосомы F [48]. Для определения оптимального режима введения миРНКазы предварительно были изучены параметры биораспределения, эффективность накопления в опухоли и скорость элиминации Cy5.5-меченого шпилечного олигонуклеотида Cy5.5-21-F-ON (Рис. 42, Рис. 43). Для этого Cy5.5-21-F-ON перитюморально вводили в опухоль KB-8-5 в концентрации 10 мкг/мышь с последующей оценкой биораспределения методом флуоресцентной визуализации *in vivo* в реальном времени.

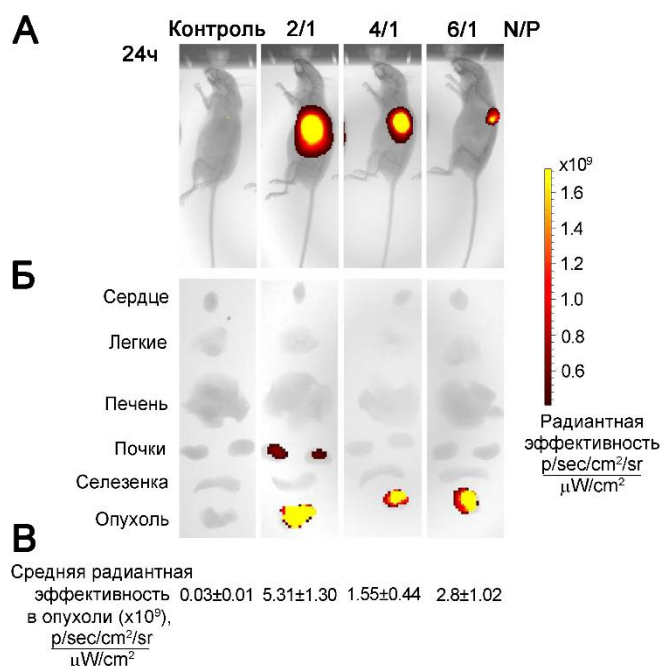


Рис. 42. Биораспределение Cy5.5-меченого олигонуклеотида Cy5.5-21-F-ON в мышах линии nude с опухолью KB-8-5 через 24 ч после инъекции. **А, Б** – демонстрационные изображения флуоресцентной визуализации в реальном времени мышей линии nude с опухолью KB-8-5 в боковой проекции (**А**) и извлеченных органов (**Б**) через 24 ч после перитюморального введения Cy5.5-21-F-ON в комплексе с катионными липосомами F при соотношении N/P 2/1, 4/1 и 6/1. Контроль – intactные мыши. (**В**) Средняя радиантная эффективность, измеренная в опухоли.

На первом этапе была проведена сравнительная оценка эффективности накопления Cy5.5-21-F-ON в мышах-опухоленосителях при введении в комплексе с липосомами F, приготовленными при различных соотношениях N/P, включая 2/1, 4/1 и 6/1 (Рис. 42). Во всех группах животных через 24 ч после введения липоплексов в опухолевой ткани регистрировался интенсивный флуоресцентный сигнал, однако максимальное накопление наблюдалось в группе, получавшей липоплексы с соотношением N/P=2/1. В этой группе значение средней радиантной эффективности было как минимум в два раза выше по сравнению с липоплексами, использованными в соотношениях N/P 4/1 и 6/1 (Рис. 42 В). Соотношение N/P 2/1 было использовано в дальнейших исследованиях для оценки кинетики накопления и выведения Cy5.5-21-F-ON из опухолевой ткани (Рис. 43 А и Б). Проведенные эксперименты показали, что

накопление олигонуклеотида в опухолевой ткани постепенно снижалось, однако оставалось на высоком уровне до 96 ч, а полное исчезновение сигнала наблюдалось к 192 ч (**Рис. 43 А и Б**).

Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии криосрезов опухолевых узлов, подтвердил накопление Су5.5-21-F-ON в опухолевой ткани (**Рис. 43 В**). Показано, что через 24 ч после введения, олигонуклеотид локализовался как в межклеточном пространстве, так и в цитоплазме опухолевых клеток.

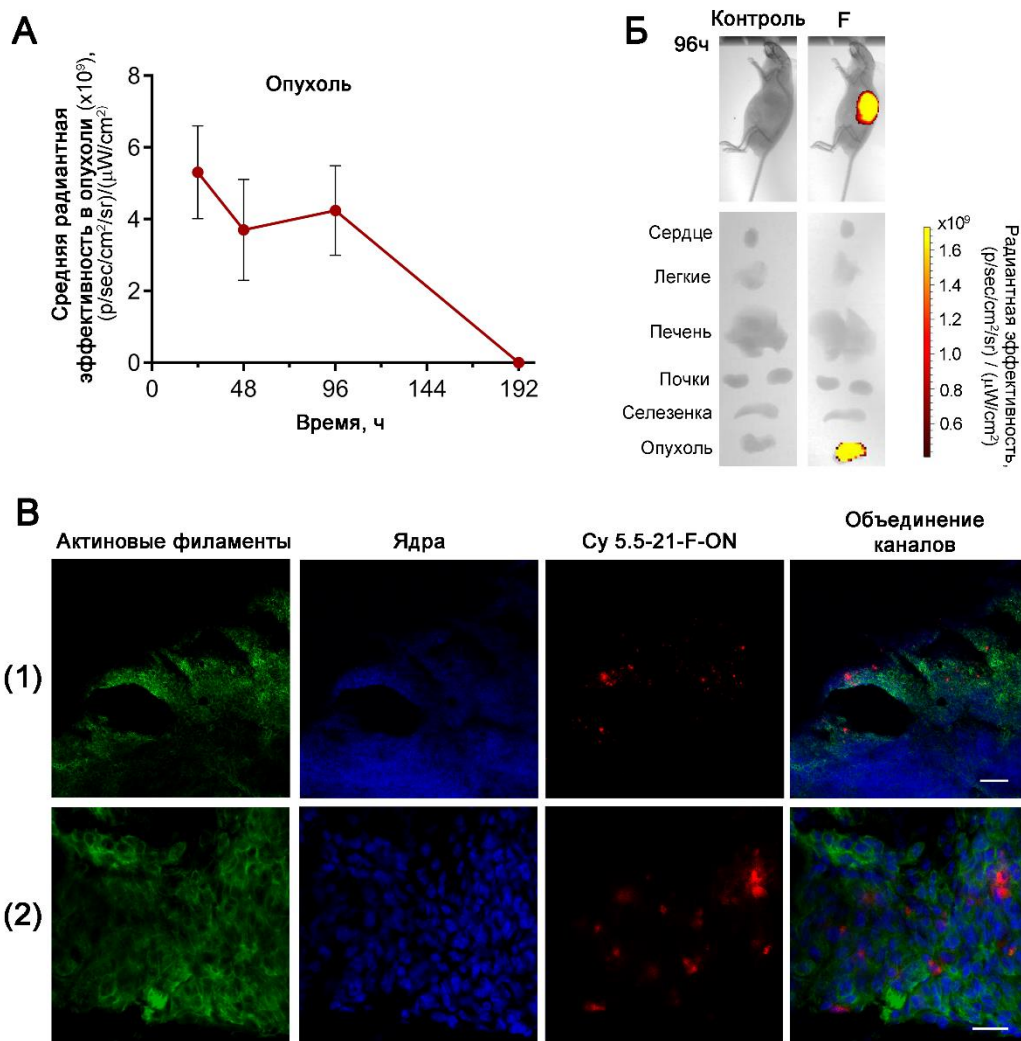


Рис. 43. Биораспределение Су5.5-меченого олигонуклеотида Су5.5-21-F-ON в мышах линии nude с опухолью KB-8-5. **А** – динамика относительной флуоресценции опухоли KB-8-5 у мышей в течение 192 ч после перитуморального введения Су5.5-21-F-ON в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F. **Б** – демонстрационные изображения флуоресцентной визуализации в реальной времени мышей линии nude с опухолью KB-8-5 в боковой проекции и извлеченных органов через 96 ч после перитуморального введения Су5.5-21-F-ON в комплексе с липосомами liposomes F при соотношении N/P = 2/1. **В** – Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии криосрезов опухоли KB-8-5 через 24 ч после перитуморального введения Су5.5-21-F-ON. Увеличение $\times 100$, шкала соответствует масштабу 20 мкм (1), и увеличение $\times 630$, шкала соответствует масштабу 100 мкм (2). Зеленый – окрашивание актиновых филаментов реагентом Phalloidin-iFluor 488; синий – окрашивание ядер с помощью DAPI, красный – визуализация Су5.5-олигонуклеотида.

Таким образом, для поддержания функциональной концентрации миРНК-21-направленных агентов в опухоли, с учётом устойчивости миРНКаз в сыворотке, кинетики подавления микроРНК, а также эффективности накопления, был выбран протокол терапии, включающий три перитуморальные инъекции 21-FC-βp с интервалом 3 дня.

Анализ динамики роста опухоли показал, что введение 21-FC-βp в дозе 5 мкг/мышь приводило к замедлению роста опухоли приблизительно на 50% по сравнению с контрольной группой животных (**Рис. 44 А и Б**). Противоопухолевый эффект миРНКазы носил кумулятивный характер: уменьшение размера опухоли становилось заметным уже на третий день после инъекции, а наиболее выраженное подавление роста наблюдалось на 18-ый день эксперимента (**Рис. 44 А и Б**).

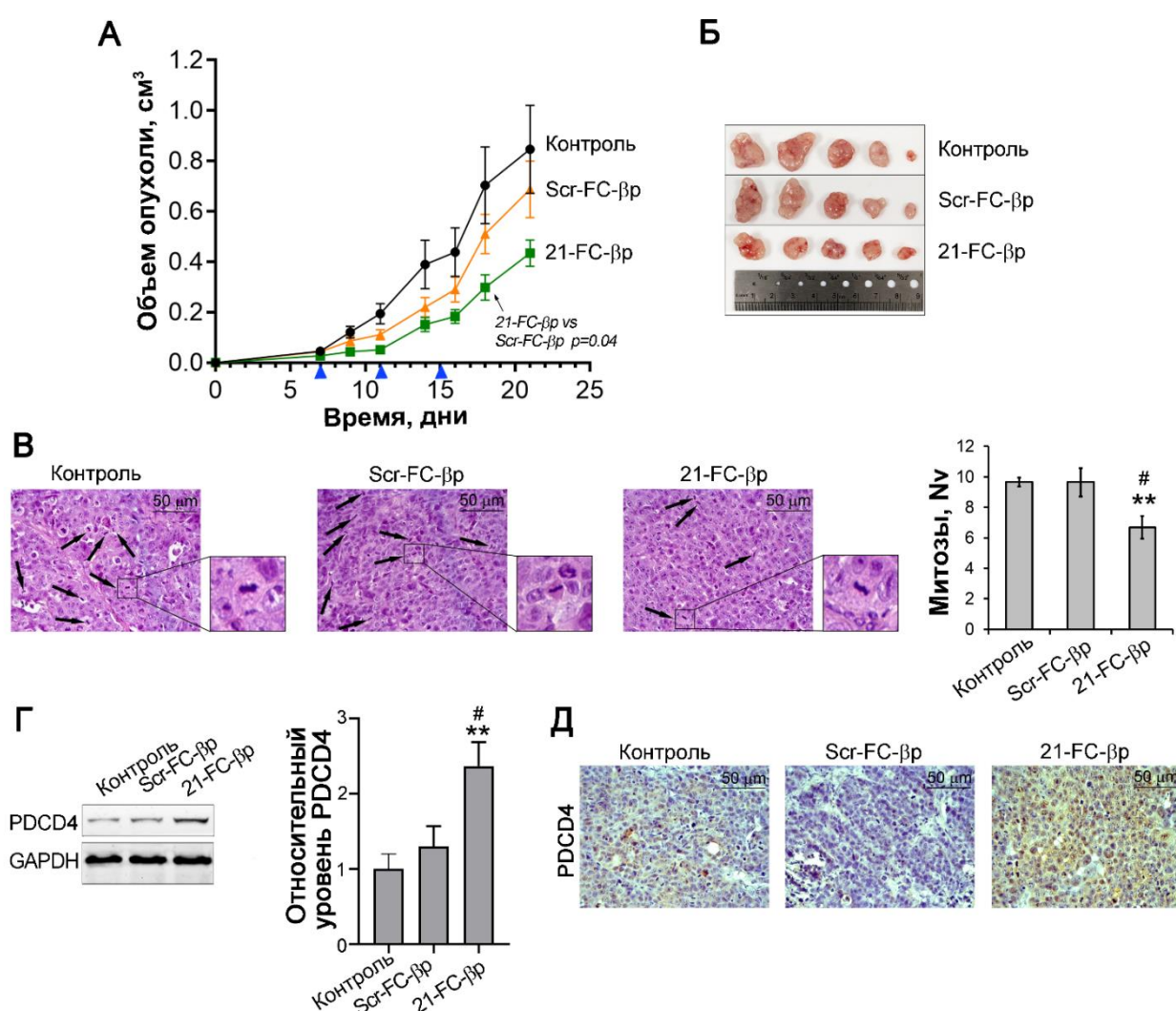


Рис. 44. Противоопухолевый эффект вилкоподобных миРНКаз. **А** – Кинетика роста опухоли KB-8-5 после перитуморальной инъекции 21-FC-βp и Scr-FC-βp в комплексе с липосомами F (N/P =2/1) мышам линии nude (n=5) в дозе 5 мкг/мышь. Дни инъекций отмечены синими стрелками. Контроль – мыши, получавшие инъекции среды Opti-MEM без липоплексов. **Б** – фотографии опухолей KB-8-5 на 21-й день после трансплантации. **В** – демонстрационные изображения срезов опухоли после окрашивания гематоксилином и эозином и морфометрический анализ опухолевой ткани с подсчетом количества митозов. Митотические события обозначены стрелками. Справа

представлены примеры митотических событий. Г – уровень белка PDCD4 в лизате опухоли KB-8-5 на 21-й день после трансплантации. Анализ выполнен методом Вестерн Блот гибридизации. Уровень PDCD4 нормировали на белок GAPDH. Д – демонстрационные изображения срезов опухоли после иммуногистохимического окрашивания с использованием первичных антител к PDCD4. ** – статистически значимые отличия от группы Контроля при $p \leq 0.01$. # – статистически значимые отличия от группы Scr-FC-βр при $p \leq 0.05$.

Гистологический анализ срезов опухоли выявил снижение митотической активности клеток на 30% в ответ на терапию миРНК-21-направленной миРНКазой 21-FC-βр (Рис. 44 В). Кроме того, в опухолевой ткани наблюдалось повышение уровня белка PDCD4, являющегося прямой мишенью миРНК-21. Методом Вестерн Блот гибридизации выявлено, что через 7 дней после последней инъекции уровень PDCD4 в опухолевом лизате увеличивался в 2.5 раза (Рис. 44 Г). Иммуногистохимическое окрашивание срезов ткани карциномы KB-8-5 с использованием специфических антител к PDCD4 подтвердило результаты Вестерн Блот гибридизации, что свидетельствует о специфичности проведённой терапии (Рис. 44 Д).

Гистологический анализ печени и почек мышей после завершения терапии показал, что ни рост карциномы, ни введение миРНКаз не вызывало патологических изменений морфологии этих органов, что указывает на потенциальную безопасность терапии на данном этапе исследований (Рис. 45).

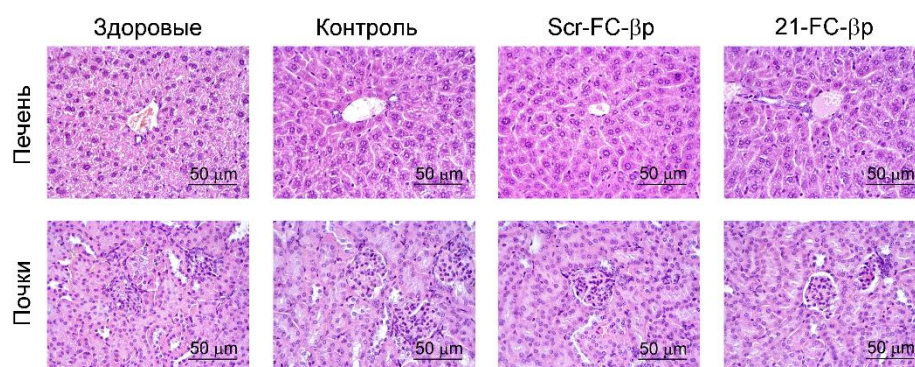


Рис. 45. Морфологические изменения в печени и почках здоровых мышей линии nude, мышей с карциномой KB-8-5 без введения миРНКаз (Контроль) и после терапии вилокподобными миРНКазами. Мыши получали три инъекции контрольного конъюгата Scr-FC-βр и анти-миРНК-21 миРНКазы 21-FC-βр в комплексе с липосомами F в дозе 5 мкг/мышь. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение×400.

Таким образом, вилокподобные миРНКазы демонстрируют выраженную противоопухолевую активность *in vivo*, характеризующуюся замедлением роста опухоли, снижением митотической активности и восстановлением экспрессии белка-супрессора PDCD4 при отсутствии токсического действия на жизненно важные органы.

В результате исследования свойств разработанных миРНКаз можно заключить, что выраженная противоопухолевая активность соединений обусловлена несколькими ключевыми факторами: (1) наличием собственной каталитической активности, (2) синергией с эндогенной

РНКазой Н1, (3) высокой стабильностью в биологической среде и (4) выбором функционально значимой микроРНК-мишени – микроРНК-21, которая является многофункциональным онкогеном и активно используется в качестве терапевтической мишени в доклинических исследованиях [100,112].

Противоопухолевый потенциал крабоподобных и ранее разработанных шпилечных микроРНКаз [47] исследовался с использованием упрощённой модели, включающей *in vitro* трансфекцию опухолевых клеток с последующей трансплантацией обработанных клеток мышам. Показано, что однократная обработка опухолевых клеток шпилечной микроРНКазой приводила к 95%-ному подавлению роста клеток лимфосаркомы RLS₄₀ у мышей [47]. Исследование противоопухолевого потенциала крабоподобных микроРНКаз на модели *ex vivo* позволило выявить непосредственную корреляцию между рибонуклеазной активностью соединений, снижением уровня микроРНК-мишени и противоопухолевым эффектом, что подтверждает ключевую роль каталитических свойств микроРНКаз в обеспечении терапевтического действия. Наиболее активная крабоподобная микроРНКаз 21-СС-pp обеспечивала 85%-ное снижение роста опухоли по сравнению с неспецифической микроРНКазой, а 21-СС-αα – около 50%. Противоопухолевый эффект сопровождался подавлением экспрессии микроРНК-мишеней и модуляцией сигнальных путей, связанных с пролиферацией и апоптозом. Важно, что полученные результаты сопоставимы или превосходят по активности ряд модифицированных олигонуклеотидов, содержащих фосфотиоатные (PS), 2'-О-метоксиэтильные (2'-МОЕ), 2'-фтор (2'-F) или ограниченные этильные (сEt) модификации, которые обеспечивали 40–80%-ное ингибирование роста опухоли на моделях гепатоцеллюлярной карциномы *ex vivo* [113].

Вилкоподобные микроРНКазы являются первыми микроРНКазами, для которых впервые исследован противоопухолевый потенциал при непосредственном введении разработанных ингибиторов животным. Трёхкратное перитуморальное введение микроРНКазы способствовало постепенному замедлению роста опухоли, с максимальным эффектом на третий день после последней инъекции (10–11-й день после первой инъекции). Динамика роста опухоли свидетельствует о том, что действие одной инъекции вилкоподобной микроРНКазы сохраняется в течение 3–4 дней. Можно предположить, что более выраженный противоопухолевый эффект может быть достигнут при продолжении терапии в выбранном режиме, а сокращение интервала между введениями до 2–3 дней может еще более повысить эффективность терапии.

Несмотря на то, что противоопухолевая эффективность вилкоподобных микроРНКаз в 1.5–2 раза ниже, чем при прямой трансфекции опухолевых клеток крабоподобными или шпилечными микроРНКазами, эти ингибиторы продемонстрировали выраженный терапевтический эффект при низких дозах и отсутствие токсического действия на жизненно важные органы.

Совокупность полученных данных демонстрирует высокий терапевтический потенциал миРНКаз и формирует прочную основу для их дальнейшего развития в качестве инновационных противоопухолевых терапевтических агентов. Использование более совершенных систем доставки и оптимизация терапевтических протоколов позволит разработать высокоэффективную стратегию лечения злокачественных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Разработано четыре серии микроРНК-направленных искусственных рибонуклеаз (миРНКаз), различающихся структурой распознающего домена, количеством и типом присоединения каталитического пептида (LRLRG)₂ и позиционированием пептида относительно функциональной области мишени. Показано, что эффективность комплексообразования с микроРНК-мишенью определяется структурными параметрами миРНКаз, включающими конфигурацию и длину олигонуклеотидного домена, наличие химических модификаций, а также нуклеотидной последовательностью микроРНК-мишени. Установлено, что максимальное связывание микроРНК (75-100%) достигается при эквимольном соотношении для двойных и петлеобразующих миРНКаз, при 2.5-кратном избытке для вилкоподобных конструкций и при 5-кратном избытке для крабоподобных миРНКаз.

2. Установлено, что рибонуклеазная активность миРНКаз определяется совокупностью факторов, включая структуру и протяженность распознающих доменов, количество, пространственную организацию и взаимное позиционирование каталитических пептидов, а также нуклеотидную последовательность микроРНК-мишени.

- Показано, что наибольшую эффективность расщепления обеспечивают крабоподобные и вилкоподобные конструкции, позволяющие достичь 60–100%-ного расщепления субстрата за 24 ч, тогда как двойные и петлеобразующие варианты разрушали мишень с эффективностью 10-20 % за то же время.

- Установлено, что наиболее активные структурные варианты миРНКаз способны работать в многооборотном режиме: при двукратном избытке микроРНК крабоподобные миРНКазы обеспечивают количественное расщепление мишени, а вилкоподобные конструкции достигают 70% деградации за 24 ч.

- Показано, что введение второго каталитического пептида в структуру петлеобразующих и крабоподобных миРНКаз приводит к синергическому расщеплению мишени с увеличением активности в 4 и 10 раз, соответственно, тогда как для вилкоподобных конструкций подобного эффекта выявлено не было.

- Показано, что присоединение пептидов к 5'-фосфату через аминоксильный линкер является более эффективным подходом, обеспечивающим увеличение степени расщепления мишени в 2-4 раза по сравнению с присоединением через остаток дезоксирибозы.

- Выявлена зависимость эффективности расщепления миРНКаз от нуклеотидной последовательности микроРНК-мишени: наличие чувствительных С-А и U-А связей в одноцепочечных участках, доступных для каталитической атаки пептидов, существенно

увеличивают степень деградации мишени (на 25-50%) под действием структурно аналогичных вариантов миРНКаз.

3. Установлено выраженное потенцирующее действие комбинации миРНКаз с РНКазой Н1, приводящее к синергетическому увеличению эффективности расщепления микроРНК-мишеней до 3–120 раз в зависимости от структуры миРНКазы. Максимальный синергический эффект (до 80–120 раз) наблюдался для двойных и петлеобразующих миРНКаз, а наибольшую суммарную каталитическую эффективность в комбинации с РНКазой Н1 продемонстрировали вилкоподобные и крабоподобные конструкции, обеспечивающие количественное расщепление мишени за 8 и 12 часов, соответственно.

4. Крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы проявляли высокую биологическую и противоопухолевую активность, обеспечивающуюся за счет каталитической природы действия, стабильности в клеточной среде и селективного подавления онкогенных микроРНК-мишеней. Наиболее активные варианты миРНКаз обеспечивали подавление пролиферативной и миграционной активности опухолевых клеток на 50-60% *in vitro*, а также вызывали ингибирование роста опухолей у мышей на 50-85%. На примере крабоподобных конструкций установлена прямая зависимость между уровнем рибонуклеазной активности, степенью подавления онкогенных микроРНК-мишеней в опухолевых клетках и противоопухолевым эффектом на мышах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fu M. et al. Emerging roles of tRNA-derived fragments in cancer // *Mol. Cancer*. 2023. Vol. 22, № 1. P. 30.
2. Di Fazio A., Gullerova M. An old friend with a new face: tRNA-derived small RNAs with big regulatory potential in cancer biology // *Br. J. Cancer*. 2023.
3. Chen Y., Shao Z., Wu S. Research progress on the tsRNA biogenesis, function, and application in lung cancer // *Non-coding RNA Res*. 2025. Vol. 10. P. 63–69.
4. Jiang M. et al. piRNA associates with immune diseases // *Cell Commun. Signal*. 2024. Vol. 22, № 1. P. 347.
5. Chen S. et al. The biogenesis and biological function of PIWI-interacting RNA in cancer // *J. Hematol. Oncol*. 2021. Vol. 14, № 1. P. 93.
6. Aquino-Jarquín G. CircRNA knockdown based on antisense strategies // *Drug Discov. Today*. 2024. Vol. 29, № 8. P. 104066.
7. Nasser S., Sharifi M., Mehrzad V. Effects of hsa-piR-32877 Suppression with Antisense LNA GapmeRs on the Proliferation and Apoptosis of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. // *Int. J. Mol. Cell. Med*. 2023. Vol. 12, № 1. P. 18–29.
8. Mattick J.S. et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2023. Vol. 24, № 6. P. 430–447.
9. Dexheimer P.J., Cochella L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism // *Front. Cell Dev. Biol. Front Cell Dev Biol*, 2020. Vol. 8. P. 409.
10. Bofill-De Ros X., Vang Ørom U.A. Recent progress in miRNA biogenesis and decay // *RNA Biol. RNA Biol*, 2024. Vol. 21, № 1. P. 1–8.
11. O'Brien J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2018. Vol. 9. P. 402.
12. Vishnoi A., Rani S. miRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Updated Overview. // *Methods Mol. Biol. Humana Press Inc.*, 2023. Vol. 2595. P. 1–12.
13. Rupaimoole R., Slack F.J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases // *Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 16, № 3. P. 203–221.
14. Gebert L.F.R., MacRae I.J. Regulation of microRNA function in animals // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019. Vol. 20, № 1. P. 21–37.
15. Inoue J., Inazawa J. Cancer-associated miRNAs and their therapeutic potential // *J. Hum. Genet*. 2021. Vol. 66, № 9. P. 937–945.
16. Zhang B. et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. // *Dev. Biol. Dev Biol*, 2007.

Vol. 302, № 1. P. 1–12.

17. Di Giorgio A., Tran T.P.A., Duca M. Small-molecule approaches toward the targeting of oncogenic miRNAs: roadmap for the discovery of RNA modulators // *Future Med. Chem.* 2016. Vol. 8, № 7. P. 803–816.
18. Lorenz D.A., Song J.M., Garner A.L. High-throughput platform assay technology for the discovery of pre-microRNA-selective small molecule probes // *Bioconjug. Chem.* 2015. Vol. 26, № 1. P. 19–23.
19. Gumireddy K. et al. Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2008. Vol. 47, № 39. P. 7482–7484.
20. Chang H. et al. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 22312.
21. Yang J. et al. CRISPR/Cas9-mediated noncoding RNA editing in human cancers // *RNA Biol.* 2018. Vol. 15, № 1. P. 35–43.
22. Hussen B.M. et al. Targeting miRNA by CRISPR/Cas in cancer: advantages and challenges // *Mil. Med. Res.* 2023. Vol. 10, № 1.
23. Choi W.-Y., Giraldez A.J., Schier A.F. Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430 // *Science (80-.).* 2007. Vol. 318, № 5848. P. 271–274.
24. Wang Z. The principles of miRNA-masking antisense oligonucleotides technology. // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 676. P. 43–49.
25. Patutina O.A. et al. Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced in vivo therapeutic potency // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. Vol. 117, № 51. P. 32370–32379.
26. Gaponova S. et al. Single Shot vs. Cocktail: A Comparison of Mono- and Combinative Application of miRNA-Targeted Mesyl Oligonucleotides for Efficient Antitumor Therapy // *Cancers (Basel).* 2022. Vol. 14, № 18. P. 4396.
27. Lennox K.A., Vakulskas C.A., Behlke M.A. Non-nucleotide modification of anti-miRNA oligonucleotides. // *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1517. P. 51–69.
28. Boutla A. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 17. P. 4973–4980.
29. Zhang R. et al. The effect of antisense inhibitor of miRNA 106b~25 on the proliferation, invasion, migration, and apoptosis of gastric cancer cell // *Tumor Biol.* 2016. Vol. 37, № 8. P. 10507–10515.
30. Zeniya S. et al. Angubindin-1 opens the blood–brain barrier in vivo for delivery of antisense

- oligonucleotide to the central nervous system // *J. Control. Release*. 2018. Vol. 283. P. 126–134.
31. Lima J.F. et al. Anti-miRNA oligonucleotides: A comprehensive guide for design // *RNA Biol*. 2018. Vol. 15, № 3. P. 338–352.
32. Miroshnichenko S.K. et al. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2019. Vol. 116, № 4. P. 1229–1234.
33. Ebert M.S., Neilson J.R., Sharp P.A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells // *Nat. Methods*. 2007. Vol. 4, № 9. P. 721–726.
34. Ebert M.S., Sharp P.A. MicroRNA sponges: Progress and possibilities // *RNA*. 2010. Vol. 16, № 11. P. 2043–2050.
35. Liang A.-L. et al. miRNA-10b sponge: An anti-breast cancer study in vitro // *Oncol. Rep*. 2016. Vol. 35, № 4. P. 1950–1958.
36. Gao S. et al. miRNA oligonucleotide and sponge for miRNA-21 inhibition mediated by PEI-PLL in breast cancer therapy // *Acta Biomater*. 2015. Vol. 25. P. 184–193.
37. Liu S. et al. A microRNA 221– and 222–Mediated Feedback Loop Maintains Constitutive Activation of NFκB and STAT3 in Colorectal Cancer Cells // *Gastroenterology*. 2014. Vol. 147, № 4. P. 847–859.e11.
38. Mignacca L. et al. Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers // *Cytokine*. 2016. Vol. 82. P. 80–86.
39. Jie J. et al. Generation of MiRNA sponge constructs targeting multiple MiRNAs. // *J. Clin. Lab. Anal*. 2022. Vol. 36, № 7. P. e24527.
40. Meng L. et al. Small RNA zippers lock miRNA molecules and block miRNA function in mammalian cells // *Nat. Commun*. 2017. Vol. 8. P. 13964.
41. Danneberg F. et al. Sequence-specific RNA cleavage by PNA conjugates of the metal-free artificial ribonuclease tris(2-aminobenzimidazole) // *Beilstein J. Org. Chem*. 2015. Vol. 11. P. 493–498.
42. Zellmann F. et al. Site-specific cleavage of RNAs derived from the PIM1 30-UTR by a metal-free artificial ribonuclease // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 4.
43. Zellmann F. et al. Quality Control of mRNA Vaccines by Synthetic Ribonucleases: Analysis of the Poly-A-Tail // *ChemBioChem*. 2024. Vol. 25, № 13.
44. Gaglione M. et al. PNA-based artificial nucleases as antisense and anti-miRNA oligonucleotide agents // *Mol. Biosyst*. 2011. Vol. 7, № 8. P. 2490.
45. Patutina O.A. et al. miRNases: Novel peptide-oligonucleotide bioconjugates that silence miR-21 in lymphosarcoma cells // *Biomaterials*. 2017. Vol. 122. P. 163–178.
46. Patutina O.A. et al. Peptide-oligonucleotide conjugates exhibiting pyrimidine-X cleavage

- specificity efficiently silence miRNA target acting synergistically with RNase H // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–15.
47. Patutina O.A. et al. Catalytic knockdown of miR-21 by artificial Ribonuclease: Biological performance in tumor model // *Front. Pharmacol.* 2019. Vol. 10. P. 1–13.
 48. Kabilova T.O. et al. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. Vol. 123. P. 59–70.
 49. Chen C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 20. P. e179.
 50. Bartel D.P. Metazoan MicroRNAs // *Cell.* 2018. Vol. 173, № 1. P. 20–51.
 51. Willkomm S. et al. Single-molecule FRET uncovers hidden conformations and dynamics of human Argonaute 2 // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 3825.
 52. Becker W.R. et al. High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2 // *Mol. Cell.* 2019. Vol. 75, № 4. P. 741–755.e11.
 53. Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J. Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC // *Cell.* 2018. Vol. 173, № 4. P. 946–957.
 54. Xiao Y., Macrae I.J. Robust differential microRNA targeting driven by supplementary interactions in vitro // *RNA. RNA*, 2020. Vol. 26, № 2. P. 162–174.
 55. Pawlica P. et al. How Complementary Targets Expose the microRNA 3' End for Tailing and Trimming during Target-Directed microRNA Degradation // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2019. Vol. 84. P. 179–183.
 56. Mohamed A.A. et al. The structural basis for RNA slicing by human Argonaute2 // *Cell Rep.* 2025. Vol. 44, № 1. P. 115166.
 57. Fuchs Wightman F. et al. Target RNAs Strike Back on MicroRNAs // *Front. Genet.* 2018. Vol. 9.
 58. Han J., Mendell J.T. MicroRNA turnover: a tale of tailing, trimming, and targets. // *Trends Biochem. Sci. Trends Biochem Sci*, 2023. Vol. 48, № 1. P. 26–39.
 59. Shang R. et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation // *Nat. Rev. Genet.* 2023. Vol. 24, № 12. P. 816–833.
 60. Staroseletz Y. et al. Strict conformational demands of RNA cleavage in bulge-loops created by peptidyl-oligonucleotide conjugates // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 19. P. 10662–10679.
 61. Williams A. et al. Peptidyl-Oligonucleotide Conjugates Demonstrate Efficient Cleavage of RNA in a Sequence-Specific Manner // *Bioconjug. Chem.* 2015. Vol. 26, № 6. P. 1129–1143.
 62. Staroseletz Y. et al. “Dual” peptidyl-oligonucleotide conjugates: Role of conformational flexibility in catalytic cleavage of RNA. // *Biomaterials.* 2017. Vol. 112. P. 44–61.

63. Kirnos M.D. et al. 2-Amino adenine is an adenine substituting for a base in S-2L cyanophage DNA // *Nature*. 1977. Vol. 270, № 5635. P. 369–370.
64. Cheong C., Tinoco I., Chollet A. Thermodynamic studies of base pairing involving 2,6-diaminopurine // *Nucleic Acids Res.* 1988. Vol. 16, № 11. P. 5115–5122.
65. Haaima G. et al. Increased DNA binding and sequence discrimination of PNA oligomers containing 2,6-diaminopurine // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25, № 22. P. 4639–4643.
66. Murtola M., Wenska M., Strömberg R. PNazymes that are artificial RNA restriction enzymes // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132, № 26. P. 8984–8990.
67. Hall J., Husken D., Haner R. Towards Artificial Ribonucleases: The Sequence-Specific Cleavage of RNA in a Duplex // *Nucleic Acids Res.* 1996. Vol. 24, № 18. P. 3522–3526.
68. Murtola M. et al. Zinc Ion-Dependent peptide nucleic acid-based artificial enzyme that cleaves RNA-Bulge size and sequence dependence // *Molecules*. 2017. Vol. 22, № 11.
69. Luige O. et al. Further probing of Cu²⁺-dependent PNazymes acting as artificial RNA restriction enzymes // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 4. P. 1–12.
70. Kuznetsova I.L. et al. Enhanced RNA Cleavage Within Bulge-Loops by an Artificial Ribonuclease // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 4. P. 1201–1212.
71. Hüsken D. et al. Creating RNA bulges: cleavage of RNA in RNA/DNA duplexes by metal ion catalysis // *Biochemistry*. *Biochemistry*, 1996. Vol. 35, № 51. P. 16591–16600.
72. Bibillo A., Figlerowicz M., Kierzek R. The non-enzymatic hydrolysis of oligoribonucleotides VI. The role of biogenic polyamines // *Nucleic Acids Res.* *Nucleic Acids Res.*, 1999. Vol. 27, № 19. P. 3931–3937.
73. Riepe A., Beier H., Gross H.J. Enhancement of RNA self-cleavage by micellar catalysis // *FEBS Lett.* *FEBS Lett.*, 1999. Vol. 457, № 2. P. 193–199.
74. Amirloo B. et al. “Bind, cleave and leave”: multiple turnover catalysis of RNA cleavage by bulge-loop inducing supramolecular conjugates // *Nucleic Acids Res.* *Nucleic Acids Res.*, 2022. Vol. 50, № 2. P. 651–673.
75. Amirloo B. et al. “Bind, cleave and leave”: multiple turnover catalysis of RNA cleavage by bulge-loop inducing supramolecular conjugates // *Nucleic Acids Res.* 2022. Vol. 50, № 2. P. 651–673.
76. Hosono K. et al. Properties of base-pairing in the stem region of hairpin antisense oligonucleotides containing 2'-methoxynucleosides // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1995. Vol. 1244, № 2–3. P. 339–344.
77. Jollès B., Réfrégiers M., Laigle A. Opening of the extraordinarily stable mini-hairpin d(GCGAAGC). // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25, № 22. P. 4608–4613.
78. Khan I.M., Coulson J.M. A novel method to stabilise antisense oligonucleotides against

- exonuclease degradation // *Nucleic Acids Res.* 1993. Vol. 21, № 18. P. 4433–4433.
79. Lennox K.A., Behlke M.A. A Direct Comparison of Anti-microRNA Oligonucleotide Potency // *Pharm. Res.* 2010. Vol. 27, № 9. P. 1788–1799.
80. Vermeulen A. et al. Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function // *RNA*. 2007. Vol. 13, № 5. P. 723–730.
81. Hirao I. et al. Extraordinarily stable mini-hairpins: electrophoretical and thermal properties of the various sequence variants of d(GCGAAAGC) and their effect on DNA sequencing // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 15. P. 3891–3896.
82. Yoshizawa S. et al. Nuclease resistance of an extraordinarily thermostable mini-hairpin DNA fragment, d(GCGAAGC) and its application to in vitro protein synthesis // *Nucleic Acids Res.* 1994. Vol. 22, № 12. P. 2217–2221.
83. Patutina O.A. et al. Search for oligonucleotides selectively binding oncogenic miR-21 // *Russ. J. Bioorganic Chem. Pleiades Publishing*, 2017. Vol. 43, № 1. P. 29–37.
84. Mironova N.L. et al. RNase T1 mimicking artificial ribonuclease // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 7. P. 2356–2367.
85. Vlassov V.V. et al. Cleavage of tRNA With Imidazole and Spermine Imidazole Constructs: A New Approach for Probing RNA Structure // *Nucleic Acids Res.* 1995. Vol. 23, № 16. P. 3161–3167.
86. Wike-Hooley J.L., Haveman J., Reinhold H.S. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease // *Radiotherapy and Oncology. Radiother Oncol*, 1984. Vol. 2, № 4. P. 343–366.
87. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review // *Cancer Res.* 1989. Vol. 49, № 23. P. 6449–6465.
88. De Milito A., Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors // *Future Oncology. Future Oncol*, 2005. Vol. 1, № 6. P. 779–786.
89. Mikkola S., Kaukinen U., Lönnberg H. The Effect of secondary structure on cleavage of the phosphodiester bonds of RNA // *Cell Biochem. Biophys.* 2001. Vol. 34, № 1. P. 95–119.
90. Salvio R., Casnati A. Guanidinium Promoted Cleavage of Phosphoric Diesters: Kinetic Investigations and Calculations Provide Indications on the Operating Mechanism // *J. Org. Chem.* 2017. Vol. 82, № 19. P. 10461–10469.
91. Cerritelli S.M., Crouch R.J. Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes // *FEBS Journal*. 2009. Vol. 276, № 6. P. 1494–1505.
92. Compagno D. et al. Antisense oligonucleotides containing modified bases inhibit in vitro translation of *Leishmania amazonensis* mRNAs by invading the mini-exon hairpin // *J. Biol.*

- Chem. 1999. Vol. 274, № 12. P. 8191–8198.
93. Zhang L. et al. NAT10 and DDX21 Proteins Interact with RNase H1 and Affect the Performance of Phosphorothioate Oligonucleotides // *Nucleic Acid Ther.* 2022. Vol. 32, № 4. P. 280–299.
 94. Shaw J.-P. et al. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum // *Nucleic Acids Res.* 1991. Vol. 19, № 4. P. 747–750.
 95. Kingston E.R., Bartel D.P. Global analyses of the dynamics of mammalian microRNA metabolism // *Genome Res.* 2019. Vol. 29, № 11. P. 1777–1790.
 96. Ragan C., Zuker M., Ragan M.A. Quantitative Prediction of miRNA-mRNA Interaction Based on Equilibrium Concentrations // *PLoS Comput. Biol.* / ed. Hatzigeorgiou A.G. 2011. Vol. 7, № 2. P. e1001090.
 97. Jiang L.-H. et al. miR-21 regulates tumor progression through the miR-21-PDCD4-Stat3 pathway in human salivary adenoid cystic carcinoma // *Lab. Invest.* 2015. Vol. 95, № 12. P. 1398–1408.
 98. O'Donnell K.A. et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // *Nature.* 2005. Vol. 435, № 7043. P. 839–843.
 99. Zhao X. et al. miR-17-5p promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in human osteosarcoma cells by targeting SRC kinase signaling inhibitor 1 // *J. Cell. Biochem.* 2019. Vol. 120, № 4. P. 5495–5504.
 100. Bautista-Sánchez D. et al. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* 2020. Vol. 20. P. 409–420.
 101. Bai X. et al. The MicroRNA Family Both in Normal Development and in Different Diseases: The miR-17-92 Cluster // *Biomed Res. Int.* 2019. Vol. 2019. P. 1–11.
 102. Zhu Y. et al. MiR-17-5p enhances pancreatic cancer proliferation by altering cell cycle profiles via disruption of RBL2/E2F4-repressing complexes // *Cancer Lett.* 2018. Vol. 412. P. 59–68.
 103. Radulovic V. et al. Differential response of normal and transformed mammary epithelial cells to combined treatment of anti-miR-21 and radiation // *Int. J. Radiat. Biol.* 2017. Vol. 93, № 4. P. 361–372.
 104. Chi L.H. et al. MicroRNA-21 is immunosuppressive and pro-metastatic via separate mechanisms // *Oncogenesis.* 2022. Vol. 11, № 1. P. 38.
 105. Xu L. et al. MicroRNA-21 (miR-21) Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by Targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in Lung Squamous Carcinoma, Gejiu City, China // *PLoS One* / ed. Li J. 2014. Vol. 9, № 8. P. e103698.
 106. Martin del Campo S.E. et al. MiR-21 Enhances Melanoma Invasiveness via Inhibition of Tissue

- Inhibitor of Metalloproteinases 3 Expression: In Vivo Effects of MiR-21 Inhibitor // PLoS One / ed. Gartel A.L. 2015. Vol. 10, № 1. P. e0115919.
107. Miroshnichenko S.K. et al. 2'OMe Modification of Anti-miRNA-21 Oligonucleotide–Peptide Conjugate Improves Its Hybridization Properties and Catalytic Activity // Russ. J. Bioorganic Chem. 2019. Vol. 45, № 6. P. 803–812.
 108. Fang Y. et al. Aptamer-RIBOTAC Strategy Enabling Tumor-Specific Targeted Degradation of MicroRNA for Precise Cancer Therapy // Small Methods. Small Methods, 2024.
 109. Yu S. et al. Anticancer effect of hUC-MSC-derived exosome-mediated delivery of PMO-miR-146b-5p in colorectal cancer // Drug Deliv. Transl. Res. Springer, 2023. Vol. 14, № 5. P. 1352.
 110. Li Y. et al. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy // Cancer Sci. 2017. Vol. 108, № 7. P. 1493–1503.
 111. Bose D. et al. Selective inhibition of miR-21 by phage display screened peptide // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № 8. P. 4342–4352.
 112. Hashemi M. et al. Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents // Pharmacol. Res. 2023. Vol. 187. P. 106568.
 113. Wagenaar T.R. et al. Anti-miR-21 suppresses Hepatocellular carcinoma growth via broad transcriptional network deregulation // Mol. Cancer Res. American Association for Cancer Research Inc., 2015. Vol. 13, № 6. P. 1009–1021.



Отчет о проверке

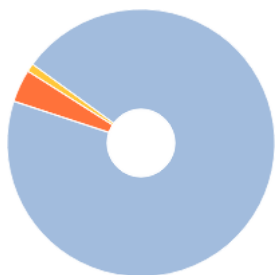
Автор: Чиглинцева Дарья Александровна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Чиглинцева_ для плагиата

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
3,78%



Оригинальность:
95,5%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
0,72%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 38

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 10.09.2025 12:37:18

Дата корректировки: 10.09.2025 12:47:18

Количество страниц: 82

Символов в тексте: 192188

Слов в тексте: 25509

Число предложений: 2172

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да
Исключение элементов документа из проверки: Нет
Выполнено распознавание текста (OCR): Да
Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

Модули поиска: Медицина, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Переводные заимствования, Цитирование, Коллекция НБУ, Сводная коллекция ЭБС, Публикации РГБ, Переводные заимствования IEEE, ИПС Адилет, СМИ России и СНГ, IEEE, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Шаблонные фразы, Рувики, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), СПС ГАРАНТ: аналитика, Диссертации НББ, Патенты СССР, РФ, СНГ, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Публикации eLIBRARY, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Перефразирования по коллекции IEEE, Кольцо вузов, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Интернет Плюс

❗ **Модули, недоступные в рамках тарифа:** Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	17,2%	0%	Чиглинцева Дарья_диплом	21 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Собственный диплом аспиранта на базе которого выполнен научный доклад
[02]	12,8%	0%	Чиглинцева Дарья_диплом	21 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Собственный диплом аспиранта на базе которого выполнен научный доклад
[03]	5,41%	0%	Гапонова, Светлана Константино... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	3,52%	0%	Гапонова, Светлана Константино... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	1,73%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	12 Апр 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	1,72%	0%	gaponova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	09 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	1,38%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	10 Фев 2023	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[08]	1,29%	0%	Гапонова, Светлана Константино... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	1,29%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	12 Апр 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	1,19%	0,48%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	19 Мая 2022	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[11]	1,08%	0%	ПЕТЛЕОБРАЗУЮЩИЕ миРНК-НАП...	23 Дек 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	0,99%	0,67%	gaponova_autoref.pdf http://niboch.nsc.ru	20 Ноя 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[13]	0,89%	0,58%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	17 Фев 2023	Переводные заимствования	
[14]	0,79%	0,11%	gaponova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	14 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[15]	0,68%	0,53%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	16 Мая 2024	Перефразированные заимствования по	

[16]	0,65%	0%	https://www.openbio.ru/openbio_t... https://openbio.ru	26 Ноя 2019	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	0,65%	0%	https://openbio.ru/openbio_tezis_2... https://openbio.ru	12 Янв 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,65%	0%	https://openbio.ru/openbio_tezis_2... https://openbio.ru	30 Мая 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,61%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[20]	0,55%	0%	https://www.openbio.ru/openbio_t... https://openbio.ru	17 Мая 2023	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[21]	0,52%	0,2%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	13 Янв 2023	Переводные заимствования	
[22]	0,37%	0,37%	Расщепление онкогенных микро...	27 Окт 2019	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[23]	0,35%	0,22%	НАПРАВЛЕННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ... http://elibrary.ru	11 Дек 2019	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[24]	0,31%	0%	%D0%B3%D0%B0%D1%86%D0%B... http://niboch.nsc.ru	15 Дек 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[25]	0,3%	0%	Ращупкин, Иван Михайлович Не... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	0,28%	0%	%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%8... http://niboch.nsc.ru	06 Июн 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[27]	0,27%	0%	Чан Ньян Хау Комбинированные ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,25%	0,25%	Выбор олигонуклеотидов, селек... http://elibrary.ru	01 Фев 2017	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[29]	0,24%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	17 Фев 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[30]	0,24%	0,24%	http://pihoc.dvo.ru/conf/Abstracts_... http://pihoc.dvo.ru	05 Апр 2024	Интернет Плюс	
[31]	0,23%	0%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ... https://elibrary.ru	20 Дек 2022	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,22%	0%	https://www.icgbio.ru/wp-content/... https://icgbio.ru	04 Окт 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,22%	0,08%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	13 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[34]	0,21%	0,21%	Цитирование продуктов Lumipro... https://ru.lumiprobe.com	14 Окт 2024	Интернет Плюс	
[35]	0,19%	0%	Эффективность чрескожных коро... http://elibrary.ru	01 Янв 2018	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,19%	0%	Lumiprobe citation list https://lumiprobe.com	15 Янв 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[37]	0,19%	0%	Цитирование продуктов Lumipro... https://ru.lumiprobe.com	14 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[38]	0,19%	0%	Способ очистки вируса осповакц... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,19%	0%	Алкилирующие фторированные ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,19%	0%	Средство для нейтрализации вир... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,19%	0%	Способ получения наноразмерн... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,19%	0%	сонин диплом на антиплагиат по...	25 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,18%	0%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДО... http://elibrary.ru	01 Янв 2012	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,15%	0%	Референтные значения уровня Д... http://elibrary.ru	14 Сен 2015	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[45]	0,15%	0,15%	Боковые петли РНК - мишени для... http://elibrary.ru	28 Авг 2007	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[46]	0,15%	0,15%	МикроРНК-направленные олиго... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[47]	0,15%	0%	ДНК-идентификация при против...	19 Мар 2025	Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[48]	0,14%	0,14%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	13 Янв 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[49]	0,14%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	17 Фев 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[50]	0,13%	0,13%	ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАН...	23 Дек 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[51]	0,13%	0%	Воронина, Евгения Игоревна Мо... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2014	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,11%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	10 Фев 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,11%	0%	Высокопроизводительное секве... http://elibrary.ru	01 Янв 2022	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,1%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	12 Апр 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,09%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	10 Фев 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,09%	0%	gaponova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	09 Окт 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Чиглинцева Дарья Александровна

«Сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы как эффективные
ингибиторы онкогенных микроРНК»

Оригинальность работы составляет 95.5%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко