

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Чиглинцева Дарья Александровна

**МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы):
каталитические свойства и противоопухолевая активность**

1.5.4 – биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Патутина Ольга Александровна

Новосибирск – 2026

Содержание

Список сокращений.....	6
Введение	10
1. Природные и искусственные рибонуклеазы: терапевтическое воздействие на транскриптом через антисенс-опосредованную инактивацию РНК (Обзор литературы)..	15
Введение	15
1.1. РНКазы H1 как ключевой фермент, обеспечивающий биологическую активность антисмысловых олигонуклеотидов	17
1.1.1. Структура, механизм действия и физиологические функции РНКазы H1	17
1.1.2. Использование РНКазы H1 для направленного ингибирования активности внутриклеточных РНК антисмысловыми олигонуклеотидами	20
1.1.2.1. Кинетические параметры деградации РНК-мишени под действием РНКазы H1	20
1.1.2.2. Химические модификации антисмысловых олигонуклеотидов, не препятствующие активности РНКазы H1.....	21
1.1.2.3. Терапевтическое применение антисмысловых олигонуклеотидов, функциональная активность которых реализуется за счет действия РНКазы H1	27
1.2. РНКазы Р-опосредованное ингибирование РНК с использованием внешних направляющих последовательностей (EGS).....	28
1.3. Белки семейства Argonaute для ингибирования РНК-мишени	30
1.3.1. Структура, механизм действия и основные функции белков AGO.....	30
1.3.2. AGO-опосредованное ингибирование РНК с использованием одноцепочечных олигонуклеотидов.....	33
1.3.2.1. Одноцепочечные siРНК.....	36
1.3.2.2. Одноцепочечные мимимики miРНК	40
1.3.2.3. Малые tРНК-производные РНК.....	41
1.4. PIWI белки как ключевые медиаторы РНК-ингибирующего действия piРНК.....	44
1.4.1. Структура, механизм действия и основные функции белков PIWI.....	44
1.4.2. PIWI-опосредованное ингибирование РНК под действием синтетических piРНК.....	47
1.5. Сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы (иРНКазы) с собственной каталитической активностью	48
Заключение.....	50
2. Экспериментальная часть.....	54
2.1. Материалы	54
2.1.1. Реактивы и препараты	54
2.1.2. Оборудование.....	54

2.1.3. Олигонуклеотиды и миРНКазы	55
2.1.4. Буферы и растворы.....	58
2.1.5. Трансфицирующие агенты и системы доставки <i>in vivo</i>	59
2.1.6. Клеточные культуры	59
2.1.7. Лабораторные животные	59
2.2. Методы	60
2.2.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в нативных условиях.....	60
2.2.2. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях	60
2.2.3. Введение радиоизотопной метки в состав миРНК с использованием полинуклеотидкиназы	60
2.2.4. Гибридизация олигонуклеотидов и миРНКаз с миРНК	60
2.2.5. Расщепление миРНК с помощью миРНКаз	60
2.2.6. рН-зависимое расщепление миРНК под действием двойных миРНКаз.....	61
2.2.7. Расщепление миРНК под действием миРНКаз в присутствии фермента РНКазы H1	61
2.2.8. Частичный гидролиз миРНК в денатурирующих условиях.....	62
2.2.9. Анализ эффективности гибридизации и расщепления миРНК.....	62
2.2.10. Нуклеазоустойчивость миРНКаз и олигонуклеотидов в ростовой среде	63
2.2.11. Приготовление комплексов катионных липосом и нуклеиновых кислот	63
2.2.12. Трансфекция клеток олигонуклеотидами и миРНКазами.....	63
2.2.13. Выделение суммарной клеточной РНК из опухолевых клеток	64
2.2.14. Определение уровня экспрессии миРНК в опухолевых клетках методом количественной ОТ-ПЦР	64
2.2.14.1. Обратная транскрипция с использованием специфических шпилечных праймеров	64
2.2.14.2. ПЦР в режиме реального времени	65
2.2.15. Исследование влияния миРНКаз на выживаемость клеток методом WST и МТТ.....	65
2.2.16. Исследование влияния миРНКаз на пролиферацию клеток в режиме реального времени с помощью системы xCelligence	66
2.2.17. Определение уровня белков-мишеней миРНК в опухолевых клетках и опухолевой ткани методом Вестерн-блот гибридизации.....	66
2.2.19. Исследование миграционной активности опухолевых клеток методом scratch теста ..	67
2.2.20. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз <i>ex vivo</i>	67
2.2.21. Исследование биораспределения вилокподобного олигонуклеотида <i>in vivo</i>	67
2.2.22. Конфокальная микроскопия криосрезов опухоли.....	68
2.2.23. Противоопухолевая активность вилокподобных миРНКаз <i>in vivo</i>	68

2.2.24. Гистологический анализ опухолевых тканей	69
2.2.25. Статистический анализ данных	69
3. МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы):	
каталитические свойства и противоопухолевая активность (результаты и обсуждение)..	70
3.1. Дизайн миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз.....	70
3.1.1. Дизайн двойных миРНКаз	74
3.1.2. Дизайн петлеобразующих миРНКаз	75
3.1.3. Дизайн крабоподобных миРНКаз	78
3.1.4. Дизайн вилкоподобных миРНКаз	81
3.2. Исследование гибридизационных свойств разработанных миРНКаз.....	84
3.2.1. Исследование гибридизационных свойств двойных миРНКаз.....	84
3.2.2. Исследование гибридизационных свойств петлеобразующих миРНКаз	86
3.2.3. Исследование гибридизационных свойств крабоподобных миРНКаз.....	88
3.2.4. Исследование гибридизационных свойств вилкоподобных миРНКаз	89
3.3. Исследование каталитической активности и нуклеотидной специфичности	
разработанных миРНКаз	90
3.3.1. Исследование рибонуклеазной активности двойных миРНКаз.....	92
3.3.2. Исследование рибонуклеазной активности петлеобразующих миРНКаз	97
3.3.3. Исследование рибонуклеазной активности крабоподобных миРНКаз.....	101
3.3.3. Исследование рибонуклеазной активности вилкоподобных миРНКаз	105
3.4. Исследование эффективности расщепления миРНК-мишеней под действием	
комбинации миРНКаз и РНКазы Н1	111
3.4.1. Исследование эффективности расщепления миРНК при совместном действии двойных миРНКаз и РНКазы Н1	111
3.4.2. Исследование эффективности расщепления миРНК при совместном действии петлеобразующих миРНКаз и РНКазы Н1	114
3.4.3. Исследование эффективности расщепления миРНК при совместном действии крабоподобных миРНКаз и РНКазы Н1	117
3.4.4. Исследование эффективности расщепления миРНК при совместном действии вилкоподобных миРНКаз и РНКазы Н1	123
3.5. Исследование устойчивости разработанных миРНКаз к действию внутриклеточных	
нуклеаз.....	126
3.5.1. Исследование нуклеазоустойчивости крабоподобных миРНКаз	126
3.5.3. Исследование нуклеазоустойчивости вилкоподобных миРНКаз.....	127

3.6. Исследование биологической активности и терапевтического потенциала миРНКаз на опухолевых моделях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>.	128
3.6.1. Исследование биологической активности крабоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток <i>in vitro</i>	129
3.6.2. Исследование биологической активности вилкоподобных миРНКаз на линиях опухолевых клеток <i>in vitro</i>	134
3.6.3. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.....	138
3.6.4. Исследование противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз на опухолевой модели у мышей.....	140
Заключение	146
Выводы	149
Список литературы	151

Список сокращений

В настоящей работе использованы следующие сокращения:

2'-F- <i>tc</i> -ANA	–	2'-β-фторо-трициклический арабинонуклеотид
2'-F	–	2'-фтор модификация
2'-OMe	–	2'-О-метильная модификация
2'-O-MOE	–	2'-О-(2-метоксиэтильная) модификация
3'-UTR	–	3'-нетранслируемая область
3dT	–	3'-дезокситимидин
4'-(<i>S/R</i>)-2-APoT	–	4'-С-2-аминопропокси тимидин в <i>S</i> или <i>R</i> конфигурации
5'-(<i>E</i>)-VP	–	5'-(<i>E</i>)-винилфосфонатная модификация
5'-HP	–	5'-гидроксифосфонатная модификация
5'-MEP	–	5'-О-метиленфосфонатная модификация
6'-diF-bc4,3-DNA	–	6'-дифторо[4.3.0]бициклический нуклеотид
6'-F-bc4,3-DNA	–	6'-фторо[4.3.0]бициклический нуклеотид
AcPO	–	Фосфоацетатная модификация
AcPS	–	Тиофосфоацетатная модификация
ADAM33	–	Металлопротеаза ADAM домен 33
AEoT	–	4'-С-аминоэтокси- тимидин
AGO	–	Argonaute
ANA	–	Арабинонуклеиновая кислота
ANP	–	Предсердный натрийуретический пептид
ANXA2	–	Аннексин А2
ApoB-100	–	Аполипротеин В-100
Apo-CIII	–	Аполипротеин СIII
araU ^P и araC ^P	–	С5-пропинил-арабиноуридин и -арабиноцитидин
ATP	–	Аденозинтрифосфат
BC	–	Петлеобразующая миРНК-направленная искусственная рибонуклеаза
Bcl211	–	Белок 1, подобный Bcl-2
BNP	–	Натрийуретический пептид типа В
BP	–	Боранфосфатная модификация
BTP	–	1,3-бис[трис(гидроксиметил)метиламино]пропан
CACNA1d	–	Потенциал-зависимый кальциевый канал, субъединица альфа 1D
CAT	–	Каталитический домен
CC	–	Крабоподобная миРНК-направленная искусственная рибонуклеаза
CCL3	–	Хемокиновый лиганд мотива CC 3
CCR4-NOT	–	Комплекс белка репрессии углеродного катаболита 4 и отрицательного регулятора генов без ТАТА-бокса
CCR5	–	СС-хемокиновый рецептор 5
CD	–	Спейсерный домен
CeNA	–	Циклогексенильная нуклеиновая кислота
cEt	–	2',4'-ограниченная 2'-О-этил нуклеиновая кислота

CRISPR	– Короткие палиндромные потворы, регулярно расположенные группами
CTNNB1	– Катенин бета 1
CTTN	– Кортактин
Cy5.5	– Флуорофор Cyanine 5.5
DC	– Двойная миРНК-направленная искусственная рибонуклеаза
DMEM	– Культуральная среда Дульбекко в модификации Игла
DNCA/CLD	– Нейтральный цитидиниловый липид/ катионный липид
DTT	– Дитиотреитол
EDTA	– Этилендиаминтетрауксусная кислота
EFNA5	– Эфрин А5
EGS	– Внешняя направляющая последовательность
eIF4F	– Эукариотический фактор инициации трансляции 4F
FANA	– 2'-дезоксид-2'-фторо-β-D-арабинонуклеиновая кислота
FC	– Вилкоподобная миРНК-направленная искусственная рибонуклеаза
FGL1	– Фибриноген-подобный белок 1
FOXK1	– Транскрипционный фактор Forkhead box K1
gyrA	– Субъединица А ДНК-гиразы
HBD	– Гибрид-связывающий домен
HBV	– Вирус гепатита В
HCMV	– Цитомегаловирус человека
HENMT1	– HEN метилтрансфераза 1
HIV	– Вирус иммунодефицита человека
hnRNP	– Гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды
hspA8	– Белок теплового шока семейства hsp70 8
HSV-1	– Вирус простого герпеса типа 1
HSV-2	– Вирус простого герпеса типа 2
HTT	– Гентингтин
ICP8	– Белок инфицированной клетки 8
IMDM	– Культуральная среда Дульбекко в модификации Искова
IRES	– Внутренний сайт посадки рибосомы
JAK3	– Янус-киназа 3
KRAS	– Вирус саркомы крыс Кирстена
LNA	– Замкнутая нуклеиновая кислота
MALAT1	– Транскрипт 1 аденокарциномы легкого, ассоциированный с метастазами
MCP	– Основной белок капсида
MES	– 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
MID	– Промежуточный домен
miRISC	– миРНК-индуцируемый комплекс выключения гена
MOV10L1	– Mov10-подобная РНК-геликаза 1
MTS	– Последовательность распознавания митохондрий
MTT	– 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
NAT10	– N-ацетилтрансфераза 10

NPC1	– Белок Нимана-Пика С1
NPM1	– Нуклеофосмин 1
ON	– Олигодезоксирибонуклеотид
P54nrb	– Ядерный РНК-связывающий белок, 54 кДа
PAPSS2	– 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфатсинтетаза 2
PAZ	– PIWI-Argonaute-Zwille
PBS	– Фосфатно-солевой буфер
PC4	– Положительный кофактор 4
PF	– Фосфоноформатная модификация
piRISC	– PiРНК-индуцируемый комплекс подавления генов
PIWI	– От англ. P element induced wimpy testis
piРНК	– PIWI-взаимодействующая рибонуклеиновая кислота
PLD6	– Фосфолипаза D, член семейства 6
PNLDC1	– Экзонуклеаза, содержащая домен, подобный рибонуклеазе PARN 1
pre-tRNA	– Предшественник транспортной рибонуклеиновой кислоты
PS	– Фосфоротиоатная модификация
PSA	– Персульфат аммония
PTEN	– Гомолог фосфатазы и тензина
RISC	– РНК-индуцируемый комплекс выключения гена
SA	– Ацетат натрия
SARS-CoV-2	– Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2
SDS	– Додecilсульфат натрия
siРНК	– Малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота
SOD1	– Супероксиддисмутаза 1
SPS	– Фосфородитиоатная модификация
TCF4	– Фактор транскрипции 4
TCP1	– Белок Т-комплекса 1
TDMD	– РНК-направленная деградация миРНК
TEMED	– N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
THBS1	– Тромбоспондин 1
tiРНК	– Производные транспортных РНК, образующиеся в ответ на клеточный стресс
Tnfrsf10b	– Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 10В
tRF	– Фрагменты транспортной РНК
tsRNA	– Малая РНК, производная транспортной РНК
TTR	– Транстиретин
tyРНК	– Короткая (tiny) рибонуклеиновая кислота
UNA	– Разомкнутая нуклеиновая кислота
VARs	– Валил-tРНК-синтетаза
WST	– Водорастворимые тетразолиевые соли
ZBP1	– Белок, связывающий Z-ДНК 1
μ	– Метилсульфонил фосфорамидатная модификация
a.o.	– Аминокислотный остаток
ACO	– Антисмысловый олигонуклеотид

БЭС	– Бычья эмбриональная сыворотка
ВЭЖХ	– Высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО	– Диметилсульфоксид
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
днкРНК	– Длинная некодирующая рибонуклеиновая кислота
дц	– Двухцепочечный
ДЭТА	– Диэтилентриамин
иРНКза	– Искусственная рибонуклеаза
миРНК	– Микрорибонуклеиновая кислота
миРНКза	– МиРНК-направленная искусственная рибонуклеаза
мРНК	– Информационная рибонуклеиновая кислота
мяРНК	– Малая ядерная рибонуклеиновая кислота
н.	– Нуклеотид
н.д.	– Нет данных
ОТ	– Обратная транскрипция
оц	– Одноцепочечный
ПААГ	– Полиакриламидный гель
ПНК	– Пептидо-нуклеиновая кислота
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
ПЭГ	– Полиэтиленгликоль
РНК	– Рибонуклеиновая кислота
РНКза	– Рибонуклеаза
Трис	– Трис-(оксиметил)-аминометан
тРНК	– Транспортная рибонуклеиновая кислота

Введение

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

МиРНК являются одним из наиболее изученных типов некодирующих РНК и представляют собой эндогенные одноцепочечные молекулы длиной 18–25 нуклеотидов, регулирующие посттранскрипционные этапы экспрессии генов. МиРНК контролируют широкий спектр биологических процессов, включая метаболический гомеостаз, клеточный цикл, пролиферацию, морфогенетическую дифференцировку, запрограммированную клеточную гибель и межклеточные взаимодействия [9–11]. Нарушение экспрессии миРНК ассоциировано 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 миРНК подразделяют на онкосупрессорные и онкогенные [16]. Уровень онкосупрессорных миРНК значительно снижен при опухолевых процессах, в результате чего происходит повышение уровня экспрессии их генов-мишеней, стимулирующих злокачественный рост. Онкогенные миРНК, напротив, гиперэкспрессированы при злокачественной трансформации и подавляют онкосупрессорные гены-мишени. В связи с этим, онкогенные миРНК представляют собой клинически значимые мишени для разработки перспективных противоопухолевых стратегий.

На сегодняшний день предложен ряд подходов для подавления избыточной экспрессии и функции миРНК. Разработанные стратегии различаются по механизму действия и включают как методы, направленные на нарушение процессов биогенеза миРНК, так и подходы, основанные на блокировании их функциональной активности. Для подавления миРНК на уровне биогенеза применяют низкомолекулярные ингибиторы ферментов процессинга миРНК [17–19] и систему CRISPR/Cas9 для редактирования генома вблизи локусов, кодирующих миРНК-предшественники [20–22]. Принципиально иной подход основан на применении маскирующих

олигонуклеотидов, которые связываются с 3'-нетранслируемым участком мРНК и блокируют сайты связывания миРНК [23,24]. Широкое применение получили стратегии прямого ингибирования зрелых форм миРНК. Эти подходы включают использование миРНК-направленных антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), блокирующих функцию миРНК посредством формирования комплементарного комплекса со зрелой миРНК-мишенью [25–32], миРНК-спонжей, представляющих собой мультимерные конструкции, содержащие множественные сайты связывания миРНК [33–39], а также малых РНК-зипперов – синтетических олигонуклеотидов, тандемно связывающих 3'- и 5'-концы двух миРНК с образованием протяженного дуплекса с несколькими копиями миРНК [40].

Перспективным направлением в развитии анти-миРНК терапии является разработка и применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, адресованных к зрелым миРНК – миРНКаз. миРНКазы представляют собой конъюгаты, состоящие из адресующего олигонуклеотида и ковалентно присоединенной к нему 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 АСО, вызывающих стерическое блокирование РНК-мишени, миРНКазы имеют преимущество, так как способны инициировать многооборотную реакцию разрушения многих копий миРНК и вызывать необратимое подавление её функций. Несмотря на достигнутые успехи в области разработки сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз, примеры их эффективного применения для инактивации клинически значимых миРНК в эукариотических клетках пока единичны [45,47]. В связи с этим, создание миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз, способных эффективно снижать гиперэкспрессированные онкогенные миРНК, представляет собой актуальную задачу.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлась разработка и исследование биологических свойств миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз (миРНКаз) – эффективных инструментов инактивации онкогенных миРНК.

В ходе работы решали следующие задачи:

1. Дизайн различных структурных вариантов миРНКаз и исследование их способности связываться с миРНК-мишенями (миРНК-21, миРНК-17, миРНК-155, миРНК-18a);
2. Сравнительный анализ каталитической активности разработанных серий миРНКаз и установление зависимости скорости расщепления миРНК от структуры миРНКазы;
3. Оценка потенцирующего действия РНКазы H1 на скорость расщепления миРНК-мишеней под действием комбинации миРНКазы/РНКазы H1;

4. Исследование биологической активности и терапевтического потенциала миРНКаз *in vitro* и *in vivo*, включая анализ эффективности и специфичности подавления миРНК-мишеней, функциональный ответ клеток на инактивацию определённых миРНК и изучение противоопухолевого действия миРНКаз на ксенографтных моделях у мышей.

Научная новизна полученных результатов

Впервые разработаны миРНКазы нескольких структурных типов, нацеленные на различные функциональные области миРНК, и установлены структурно-функциональные закономерности, определяющие их активность: наибольшей эффективностью обладают конъюгаты с каталитическими пептидами (LRLRG)₂, присоединёнными к концевым фосфатам, и формирующие непрерывные гетеродуплексы с миРНК. Впервые показано, что введение двух каталитических пептидов в структуру миРНКазы многократно увеличивает скорость расщепления миРНК-мишени, а синергизм действия определяется их пространственным расположением в структуре конъюгата.

Впервые показано, что синергическое действие миРНКаз всех структурных типов с РНКазой H1 обеспечивает многократное повышение скорости расщепления миРНК по всем функциональным областям.

Впервые установлена прямая корреляция между рибонуклеазной активностью миРНКаз, степенью подавления миРНК в опухолевых клетках и противоопухолевым эффектом *in vivo*, что подтверждает перспективность миРНКаз как платформы для создания высокоселективных противоопухолевых препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в создании научных основ конструирования эффективных сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз. Разработаны миРНКазы с оптимизированной структурной организацией, учитывающей особенности адресующего олигонуклеотидного домена, специфичность взаимодействия с функциональными областями миРНК, а также оптимальные варианты интеграции и позиционирования каталитических пептидов. Установленные закономерности «структура-активность» формируют теоретическую основу для создания искусственных рибонуклеаз с прогнозируемыми свойствами.

Практическая значимость работы заключается в разработке миРНКаз – препаратов нового класса, обеспечивающих эффективное подавление онкогенных миРНК за счёт их каталитического расщепления и проявляющих высокую противоопухолевую активность. Разработанные подходы могут быть адаптированы для создания эффективных препаратов,

направленных на ингибирование других классов РНК, включая рiРНК, tsRNAs, мРНК и длинные некодирующие РНК.

Основные положения, выносимые на защиту

- Включение каталитических пептидов (LRLRG)₂ в структуру миРНКаз путем их присоединения к 5'- и/или 3'-концевым фосфатам олигонуклеотида обеспечивает высокую рибонуклеазную активность и многооборотное расщепление миРНК.
- Введение двух каталитических пептидов (LRLRG)₂ в структуру миРНКаз путем их присоединения к 5'- и 3'-концевым фосфатам, либо к С1'-положению остатков дезоксирибозы обеспечивает многократное увеличение скорости расщепления миРНК-мишени за счет синергического действия пептидов.
- Степень синергического взаимодействия миРНКаз с РНКазой Н1 определяется структурой конъюгата: наибольший синергический эффект наблюдается для конструкций, формирующих два сайта связывания фермента, однако наибольшая скорость расщепления миРНК в присутствии РНКазы Н1 достигается для миРНКаз с высокой собственной каталитической активностью.
- МиРНКазы, направленные к миРНК-21 и миРНК-17, в которых каталитический пептид присоединен к 5'- и/или 3'-концу олигонуклеотида, обеспечивают эффективное и специфическое снижение уровней миРНК-мишеней в опухолевых клетках, что сопровождается снижением пролиферативной и миграционной активности клеток.
- Разработанные миРНКазы проявляют значительную противоопухолевую активность на экспериментальных опухолевых моделях MCF-7 и KB-8-5 *in vivo*, при этом степень подавления роста опухоли напрямую коррелирует с рибонуклеазной активностью конструкций.

Апробация работы и публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 экспериментальные статьи и 1 обзор в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus: *Molecules*, *International journal of Molecular Sciences*, *Biomaterials*, *Biomolecules*. Результаты работы представлены на 12 международных и всероссийских конференциях.

Личный вклад автора

Экспериментальные данные получены автором лично или при его непосредственном участии. Планирование экспериментов, анализ и обсуждение результатов проведены под руководством к.б.н. О. А. Патуиной, концепция работы разработана совместно с чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. М. А. Зенковой. Синтез и характеристика миРНКаз выполнена к.б.н. О. А. Патуиной, д-ром Б. Амирло и д-ром Т. Хейман под руководством к.х.н. Е. В. Биченковой (Университет Манчестера, Великобритания). МиРНК синтезированы к.х.н. М. И. Мещаниновой,

олигодезоксирибонуклеотиды – в Лаборатории биомедицинской химии (ИХБФМ СО РАН). Катионные липосомы F предоставлены д.х.н. М. А. Масловым (РТУ МИРЭА). Эксперименты по динамике роста опухоли проведены совместно с к.б.н. О. А. Патутиной и к.м.н. А. В. Сеньковой. Гистологический анализ, анализ биораспределения и конфокальная микроскопия проведены к.м.н. А. В. Сеньковой, Д. В. Гладких и к.б.н. О. В. Марковым, соответственно (ИХБФМ СО РАН).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Текст изложен на 179 страницах, иллюстрирован 56 рисунками, включает 6 таблиц, список литературы содержит 335 источников.

1. Природные и искусственные рибонуклеазы: терапевтическое воздействие на транскриптом через антисенс-опосредованную инактивацию РНК

(Обзор литературы)

Введение

Изучение роли внутриклеточных РНК в патогенезе заболеваний является одним из ключевых направлений современных молекулярно-биологических исследований и имеет важное значение для разработки новых диагностических и терапевтических подходов. Молекулы РНК вносят решающий вклад в регуляцию генов и синтез белков, а нарушение их регуляции всё чаще рассматривают как один из ведущих факторов развития широкого спектра патологий, включая онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и наследственные заболевания, а также иммунные дисфункции и вирусные инфекции (подробнее см. в обзорах [48–54]). Нарушения процессов биогенеза, стабильности, локализации и модификации РНК приводят к дестабилизации клеточного гомеостаза и развитию различных патологических состояний. Таким образом, направленное терапевтическое воздействие на дисфункциональные РНК представляет собой перспективную стратегию для создания инновационных лекарственных препаратов.

В последние десятилетия терапевтические нуклеиновые кислоты привлекают особое внимание исследователей как высокоспецифичные регуляторы патологических процессов на молекулярном уровне. Их действие, как правило, основано на рекрутинге эндогенных ферментативных систем, таких как РНКаза Н1, РНКаза Р и белки семейства AGO (подсемейства AGO и PIWI).

Внутриклеточные рибонуклеазы РНКаза Н1 и РНКаза Р играют ключевую роль в фундаментальных клеточных процессах репликации и транскрипции [55,56]. Помимо физиологических функций, эти ферменты обладают высоким потенциалом и в качестве инструментов антисмысловой технологии [57]. Антисмысловой подход основан на использовании синтетических антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), которые избирательно связываются с патологическими РНК-мишенями и рекрутируют РНКазу Н1 или РНКазу Р, что приводит к эндонуклеолитическому расщеплению молекулы мишени. Функциональная роль АСО не ограничивается ингибированием мРНК. Исследователи также разрабатывают олигонуклеотиды для других терапевтических целей, включая коррекцию сплайсинга и активацию трансляции. Механизм их действия зависит от участка РНК-мишени, с которым они взаимодействуют. При разработке АСО для коррекции сплайсинга создают последовательности, связывающиеся с пре-мРНК в областях границ интрон-экзон или с регуляторными мотивами сплайсинга (энхансерами/сайленсерами), что позволяет модулировать включение или исключение определённых экзонов и обеспечивает образование функциональных вариантов

белков [58]. Для активации трансляции разрабатывают АСО, связывающиеся с открытой рамкой считывания или с элементами, ингибирующими трансляцию в 5'-нетранслируемой области РНК [59,60].

Белки подсемейств AGO и PIWI являются эндорибонуклеазами, которые играют ключевую роль в посттранскрипционной регуляции генов. Белки AGO являются центральными участниками РНК-интерференции, обеспечивая расщепление или подавление трансляции комплементарных мРНК-мишеней через формирование РНК-индуцируемого комплекса подавления генов (RISC) [61]. Канонической функцией белков PIWI, которые подобно AGO обладают эндонуклеазной активностью, является подавление экспрессии транспозонов и поддержание стабильности генома в клетках зародышевой линии. Однако в недавних исследованиях было показано, что PIWI обнаруживаются и в соматических тканях и участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [4,62–66]. Белки AGO и PIWI реализуют свои регуляторные функции через взаимодействие с различными классами малых некодирующих РНК. Белки AGO связываются с малыми интерферирующими РНК (siРНК) или miРНК, которые являются хорошо охарактеризованными участниками РНК-интерференции. Современные исследования демонстрируют растущий интерес к другим типам малых РНК, в частности, к малым тРНК-производным РНК (tsРНК), для которых также была показана способность взаимодействовать с белками AGO и участвовать в подавлении экспрессии генов [67]. Белки PIWI традиционно связываются с PIWI-взаимодействующими РНК (piРНК) и регулируют активность транспозонов в клетках зародышевой линии [66]. Однако недавние исследования показали, что комплексы PIWI/piРНК могут также осуществлять посттранскрипционный контроль экспрессии генов по miРНК-подобному механизму [68,69]. РНК-интерференция является консервативным молекулярным механизмом регуляции генов, который в настоящее время рассматривают в качестве стратегии для терапии широкого спектра заболеваний человека. Значительное внимание уделяется исследованию малых некодирующих РНК в качестве потенциальных лекарственных средств. Показано, что использование синтетических олигонуклеотидов, имитирующих эндогенные малые РНК (siРНК, miРНК, tsРНК, piРНК) в сочетании с белками подсемейств AGO и PIWI обеспечивает эффективное подавление экспрессии генов.

Многолетние исследования в области разработки терапевтических нуклеиновых кислот привели к созданию нескольких поколений модифицированных олигонуклеотидов с повышенной нуклеазоустойчивостью, улучшенной специфичностью и, как следствие, повышенной биологической активностью. Эти достижения способствовали появлению клинически одобренных препаратов на основе АСО и siРНК, что подтверждает высокий потенциал данного направления [57,58,70].

Новым перспективным подходом для эффективного подавления активности РНК является использование гибридных технологий, основанных на создании сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз (иРНКаз) – соединений, которые сочетают в своей структуре олигонуклеотидный домен, необходимый для распознавания РНК-мишени, и каталитический домен, обеспечивающий её деградацию. Преимуществом такой технологии является автономная способность инициировать необратимую инактивацию РНК-мишеней без привлечения эндогенных ферментативных систем. Сочетание возможностей специфического распознавания РНК-мишеней антисмысловыми олигонуклеотидами с активностью внутриклеточных рибонуклеаз, а также совмещение этих функций в одной молекуле при создании искусственных рибонуклеаз, может значительно повысить эффективность РНК-направленных технологий, открывая новые перспективы в терапии заболеваний.

1.1. РНКазы Н1 как ключевой фермент, обеспечивающий биологическую активность антисмысловых олигонуклеотидов

1.1.1. Структура, механизм действия и физиологические функции РНКазы Н1

Эффективность снижения уровня РНК-мишени под действием антисмысловых олигонуклеотидов основана на рекрутинге внутриклеточной нуклеазы – РНКазы Н1. Представители семейства РНКазы Н были впервые описаны в 1969 г. Х. Штейном и П. Хосеном [71] и представляют собой сиквенс-неспецифические металл-зависимые ферменты, которые распознают гетеродуплекс РНК-ДНК и катализируют расщепление фосфодиэфирной связи цепи РНК с образованием продуктов с 3'-гидроксильной и 5'-фосфатной группой и высвобождением интактной цепи ДНК [56]. Ферментативная активность представителей семейства РНКазы Н обнаружена практически у всех организмов, от бактерий и архей до эукариот. Белки с активностью РНКазы Н также найдены у вирусов семейств *Retroviridae*, *Hepadnaviridae* или *Caulimoviridae* [72]. Как правило, эти ферменты функционируют как сиквенс-неспецифичные эндорибонуклеазы, но в работе Х. Ли также сообщалось, что в присутствии 3'-выступающего одноцепочечного конца ДНК в гетеродуплексе РНК-ДНК РНКазы Н проявляет экзорибонуклеазную активность, последовательно гидролизует РНК в 5'-3' направлении [73].

На основании аминокислотных последовательностей и субстратной специфичности ферменты семейства РНКазы Н подразделяют на два основных типа: РНКазы Н1 и РНКазы Н2, имеющие идентичные структурные элементы каталитического домена, но различную субстратную специфичность. Также дополнительно выделяют третий тип ферментов – РНКазы Н3, имеющую структурное сходство с РНКазой Н2, но по субстратной специфичности сходную с РНКазой Н1 [56]. Ферменты семейства РНКазы Н играют важную роль в процессах репликации и репарации. РНК-ДНК гибриды могут образовываться в клетке во время различных

физиологических процессов, таких как синтез РНК-праймеров на отстающей цепи в процессе репликации ДНК (фрагменты Оказаки), удлинение теломер, образование R-петель во время транскрипции, обратная транскрипция и ошибочное включение рибонуклеотидов ДНК-полимеразами [74]. Нокаут РНКазы H1 у мышей приводит к эмбриональной смертности [75], а мутации в генах, кодирующих РНКазу H2, приводят к развитию аутоиммунных патологий, таких как синдром Айкарди-Гутьера [76,77] или системная красная волчанка [78,79], а также рак кожи и кишечника у человека [80–82]. Помимо участия в этих важных клеточных процессах, ферменты семейства РНКазы H, в частности РНКазы H1, являются ключевыми участниками регуляции активности внутриклеточных РНК под действием антисмысловых олигонуклеотидов. Несмотря на то, что РНКазы H2 преобладает в клетках млекопитающих, лишь РНКазы H1 принимает участие в инактивации РНК-мишени под действием АСО. Вероятно, это связано с тем, что РНКазы H2 тесно связана с хроматином, тогда как РНКазы H1 присутствует как в ядре, так и в цитоплазме и митохондриях [83–85].

РНКазы H1 (Рис. 1) эукариот состоит из N-концевого гибрид-связывающего домена HBD (от англ. hybrid-binding domain) и C-концевого каталитического домена CAT (от англ. catalytic domain), которые соединены с помощью гибкого спейсерного домена CD (от англ. connecting domain), обеспечивающего пространственную подвижность C- и N-конца, необходимую для функциональной активности РНКазы H1 [86]. РНКазы H1, локализуемая в митохондриях, может содержать дополнительную N-концевую последовательность, необходимую для распознавания митохондрий – MTS (от англ. mitochondrial targeting sequence) [56,87].

Каталитический домен РНКазы H1 содержит 4 консервативных аминокислотных остатка, включающих аспарагиновую и глутаминовую кислоты, которые образуют DEDD тетраду активного центра (Рис. 1 А). За счет двух остатков лизина и триптофана HBD РНКазы H1 предпочтительно связывается с РНК-ДНК гетеродуплексами, однако, также может распознавать дцРНК и дцДНК, сродство к которым снижено в 25 и 100 раз, соответственно, и не сопровождается расщеплением [88]. РНКазы H1 покрывает один виток спирали ДНК/РНК, при этом каталитический домен располагается непосредственно напротив малой бороздки и для осуществления катализа требует наличия 2'-ОН группы в цепи РНК [86] (Рис. 1 Б). HBD домен эукариотической РНКазы H1 обеспечивает характерный паттерн расщепления субстрата, заключающийся в том, что несколько событий гидролиза происходят в результате одного HBD-опосредованного связывания фермента с субстратом, что приводит к образованию коротких фрагментов РНК, легко диссоциирующих из комплекса с ДНК [88]. Для каталитического гидролиза РНК в составе гетеродуплекса РНК-ДНК под действием РНКазы H1 необходимо наличие минимум четырех последовательно расположенных рибонуклеотидов. Фермент связывается с гетеродуплексом РНК-ДНК, имеющим параметры А формы спирали, с помощью

HBD, в результате чего происходят значительные конформационные изменения субстрата: большая бороздка дуплекса расширяется с 4.2 Å до 12.5 Å, приближаясь к параметрам Б формы нуклеиновой кислоты [89]. Эти структурные изменения способствуют каталитическому расщеплению РНК, происходящему на расстоянии 7-10 нуклеотидов от 5'-конца РНК (один виток спирали) (Рис. 1 Б).

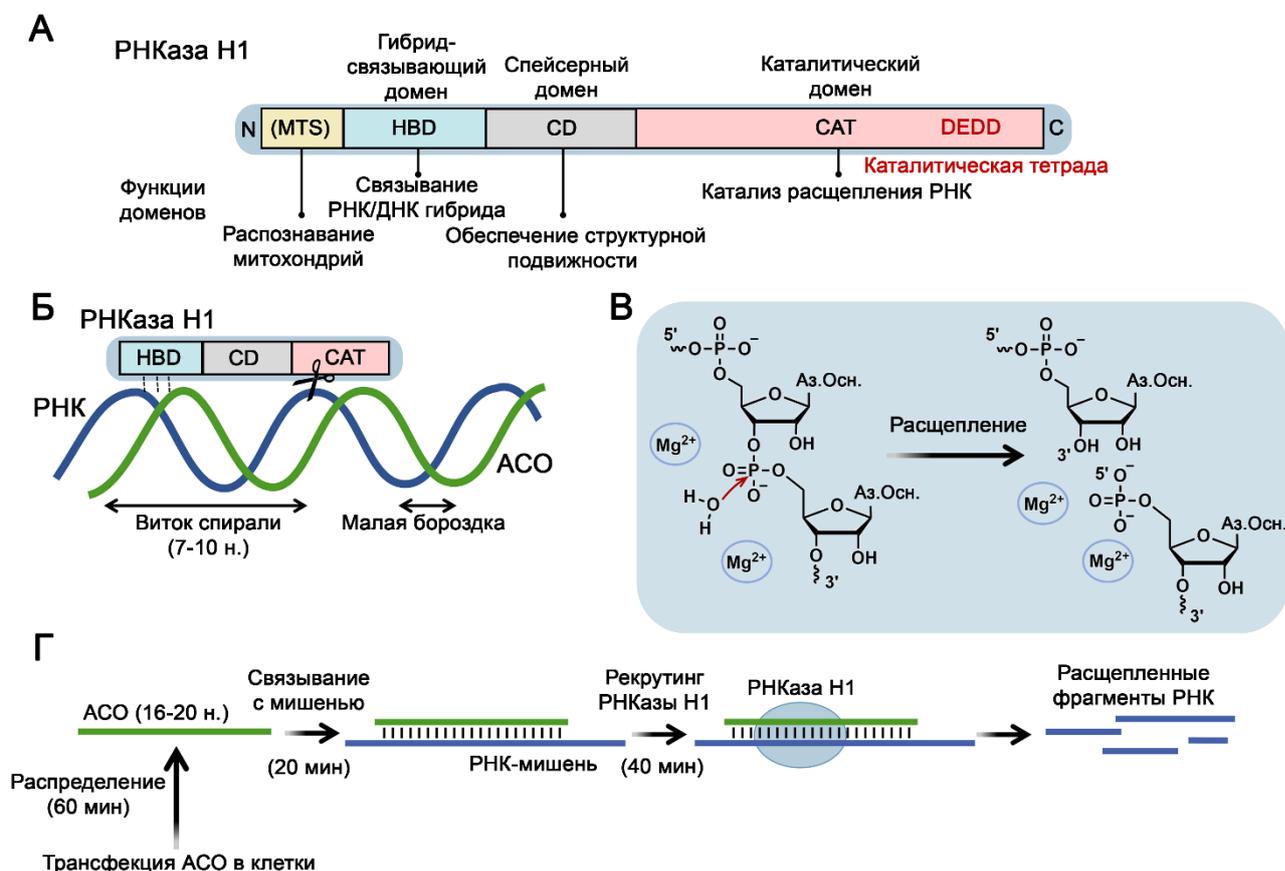


Рис. 1. Структура РНКазы Н1 эукариот и ее роль в деградации РНК мишени. **А** – доменная организация РНКазы Н1 с функциональным описанием доменов. **Б** – схема взаимодействия доменов РНКазы Н1 с гетеродуплексом РНК-ДНК (на основе рисунка из [90]). **В** – схема реакции расщепления фосфодиэфирной связи РНК, катализируемая ферментами семейства РНКазы Н. **Г** – временные параметры деградации РНК-мишени в комплексе с АСО с привлечением РНКазы Н1. В скобках указано время, которое необходимо фосфоротиоатным (PS) АСО для этапов распределения, гибридизации и рекрутинга фермента после трансфекции АСО в клетки (на основе рисунка из [91]). Аз. Осн. – азотистое основание.

Схема реакции расщепления РНК под действием ферментов семейства РНКазы Н представлена на Рис. 1 В. Реакция начинается с нуклеофильной атаки депротонированной молекулы воды на фосфат расщепляемой связи в цепи РНК, в результате чего образуется пентавалентный интермедиат. Далее происходит протонирование 3'-уходящей группы с помощью другой молекулы воды, разрыв фосфодиэфирной связи с образованием 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной групп и высвобождение продуктов из комплекса (Рис. 1 В) [56]. Для катализа необходимы ионы двухвалентных металлов, предпочтительно Mg^{2+} , которые координируются отрицательно заряженными остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот активного центра

РНКазазы Н и обеспечивают ориентирование и активацию нуклеофильной молекулы, а также способствуют дестабилизации фермент-субстратного комплекса, вызывая расщепление РНК. Исследователи до сих пор не пришли к единому мнению в отношении того, сколько ионов металлов необходимо для осуществления катализа ферментами семейства РНКазы Н. На данный момент выделяют 3 модели катализа РНКазой Н, включающие один, два или три иона металла [92]. Кроме того, было показано, что для координирования нуклеофила и субстрата для обеспечения ферментативной активности РНКазы Н также требуются одновалентные ионы K^+ [93]. Оптимальными условиями для активности РНКазы Н1 являются 1 мМ Mg^{2+} и рН 7-8 [94]. Известно также, что гидролиз могут поддерживать ионы Mn^{2+} [95], а ионы Ca^{2+} его ингибируют [96].

1.1.2. Использование РНКазы Н1 для направленного ингибирования активности внутриклеточных РНК антисмысловыми олигонуклеотидами

1.1.2.1. Кинетические параметры деградации РНК-мишени под действием РНКазы Н1

Впервые концепция избирательного подавления генов под действием АСО была предложена в начале 1970-х годов [97–99], а первые экспериментальные подтверждения были получены в бесклеточных системах [100]. Эти исследования послужили толчком к длительному и плодотворному изучению потенциала АСО в качестве терапевтических средств для лечения онкологических и вирусных заболеваний, воспалительных процессов, болезней крови, расстройств сердечно-сосудистой системы [70,90,101,102]. В зависимости от механизма действия АСО подразделяют на три основных типа: (1) РНКазы Н1-активирующие АСО; (2) АСО, вызывающие стерическое блокирование РНК; и (3) АСО, модифицирующие сплайсинг. В настоящем обзоре основное внимание уделено первому типу АСО, которые обеспечивают деградацию РНК-мишени посредством рекрутирования РНКазы Н1.

РНКаза Н1-зависимая деградация РНК-мишени в комплексе с АСО характеризуется сравнительно медленной кинетикой. Согласно исследованиям группы С. Крука с использованием фосфоротиоатных (PS) АСО было показано, что снижение количества РНК-мишени под действием АСО происходит примерно через два часа после трансфекции АСО в клетки (Рис. 1 Г). Из них 60 мин необходимо для этапа предгибридизации, когда происходит внутриклеточное распределение АСО, достижение эффективных концентраций в областях локализации целевой РНК и её распознавание, 20 мин – для гибридации с последовательностью-мишенью и 40 мин для рекрутирования и расщепления РНК-мишени РНКазой Н1 (Рис. 1 Г). На этапе гибридации на эффективность антисмыслового действия может влиять присутствие белков, способных взаимодействовать с АСО. Большинство этих белков содержат домены связывания нуклеиновых кислот или являются шаперонами.

Механизмы влияния таких белков на активность АСО могут быть различными. Например, такие белки, как Ku70/Ku80, hspA8, hnRNP и FP54nrb, ингибируют активность АСО, конкурируя с РНКазой H1 за связывание с гетеродуплексом РНК/АСО [103], тогда как белки TCP1, La/SSB, NPM1, ANXA2, VARS и PC4, наоборот, повышают активность АСО за счет изменения их субклеточной локализации [104]. Х. Ву с коллегами идентифицировали митохондриальный белок P32, задействованный в ряде метаболических процессов с участием РНК, который специфически связывается с гибридно-связывающим доменом РНКазы H1 в соотношении 1/1 и усиливает эффективность расщепления РНК-мишени РНКазой H1 за счет снижения сродства фермента к субстрату и ускорения оборота реакции [105]. Л. Чжан с коллегами выявили, что ядрышковые белки ацетилтрансфераза NAT10 и РНК хеликаза DDX21 взаимодействуют с РНКазой H1 и увеличивают скорость расщепления РНК в гетеродуплексе с фосфоротиоатными АСО, преимущественно в первые 6 часов реакции [106]. На данный момент не установлено, каким образом эти белки способствуют увеличению каталитической активности РНКазы H1, авторы предполагают, что эти белки могут связываться с РНКазой H1 и изменять ее конформацию, увеличивая ее каталитическую активность. Вероятно, оба белка, имеющие потенциальные хеликазные домены, облегчают взаимодействие РНКазы H1 с дуплексом АСО/РНК и/или способствуют диссоциации АСО и РНК после расщепления [106].

1.1.2.2. Химические модификации антисмысловых олигонуклеотидов, не препятствующие активности РНКазы H1

Природные олигодезоксирибонуклеотиды в условиях *in vivo* подвержены быстрой деградации под действием нуклеаз, поэтому для повышения стабильности в их последовательности вводят различные химические модификации. Введение модификаций в структуру олигонуклеотидов не только повышает их устойчивость к нуклеазам, но и, в ряде случаев, улучшает их гибридизационные свойства, что в совокупности способствует увеличению эффективности биологического действия. Несмотря на определенные достоинства, большинство химически модифицированных олигонуклеотидов в составе дуплекса с РНК, препятствуют его распознаванию и деградации РНК-мишени РНКазой H1.

Каталитический центр РНКазы H1 чувствителен даже к минимальным изменениям спиральной геометрии дуплекса. Для эффективного рекрутинга РНКазы H1 гетеродуплекс АСО/РНК должен удовлетворять ряду условий: (1) АСО должен обладать достаточной гибкостью, чтобы поддерживать конформацию дуплекса АСО-РНК, необходимую для реализации расщепления РНК РНКазой H1; (2) спиральная структура гетеродуплекса АСО/РНК должна характеризоваться шириной малой бороздки близкой к её ширине в природном РНК/ДНК дуплексе – 8.9–10.5 Å, в сравнении, например, с ДНК/ДНК дуплексом с шириной малой бороздки

3–7.4 Å; (3) геометрия малой бороздки должна оставаться неизменной для сохранения стерической доступности 2'-ОН РНК и обеспечения оптимального гидратного окружения [107,108]. В гетеродуплексе АСО/РНК 2'-ОН РНК является основным участником реакции РНКазы Н1-зависимого каталитического расщепления РНК. В связи с этим, введение различных модификаций в цепь АСО, затрагивающих 2'-положение рибозы или нуклеотидных оснований цепи РНК, приводящих к существенной реорганизации спиральной геометрии дуплекса, ограничивает расщепление РНКазой Н1 [107]. Несмотря на чувствительность РНКазы Н1 к структурной организации гетеродуплексов АСО/РНК, разработан ряд модификаций, совместимых с действием РНКазы Н1 (Рис. 2 А).

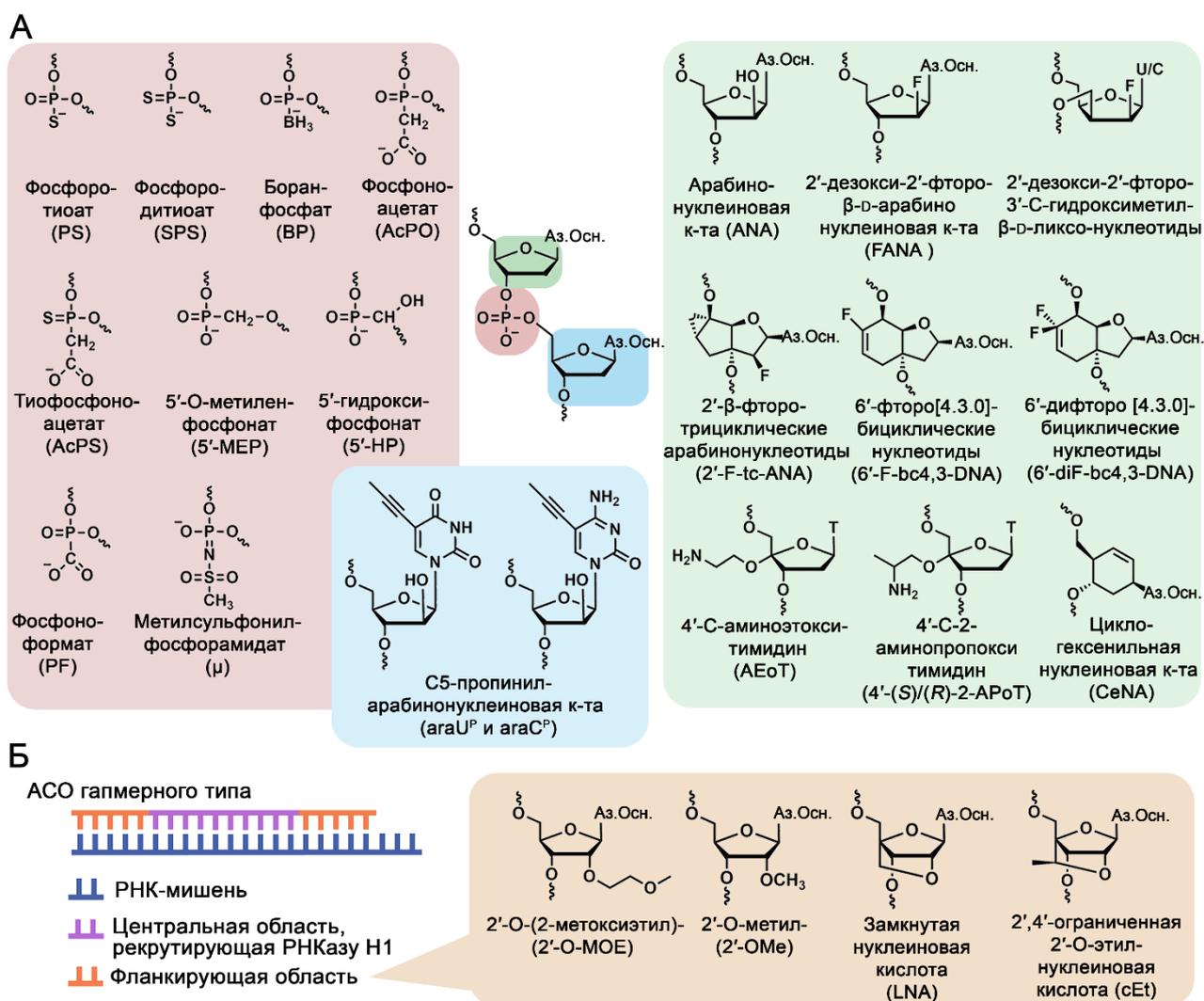


Рис. 2. Химические модификации антисмысловых олигонуклеотидов, совместимые с активностью РНКазы Н1, и структура АСО гапмерного типа. **А** – примеры химических модификаций, которые в составе АСО формируют гетеродуплексы с РНК-мишенью, распознаваемые РНКазой Н1. Красной рамкой выделены модификации фосфодиэфирной связи, зеленой – модификации остатка дезоксирибозы, а синей – модификации азотистых оснований и дезоксирибозы. **Б** – структура АСО гапмерного типа. Центральная область обеспечивает распознавание и расщепление РНК РНКазой Н1, тогда как фланкирующие области содержат химически модифицированные нуклеотиды (оранжевая рамка), повышающие аффинность к РНК-мишени и/или устойчивость к нуклеазам. Аз. Осн. – азотистое основание.

Исследования показали, что к химическим модификациям АСО, которые в наименьшей степени ограничивают способность рекрутировать РНКазу Н1, относят модификации межнуклеотидных связей, в которых один или два немостиковых атомов кислорода фосфатной группы замещены другими атомами или химическими группами. Фосфоротиоатная (PS) модификация, представляющая собой замену одного из атомов кислорода межнуклеотидной фосфатной группы на атом серы, является первой и остается наиболее распространенной модификацией антисмысловых олигонуклеотидов. Введение PS модификации обеспечивает как высокую устойчивость к нуклеазам, так и способность формировать гетеродуплекс, в составе которого РНК подвергается расщеплению под действием РНКазы Н1 (Рис. 2 А, Таблица 1) [109,110]. К дополнительным благоприятным характеристикам PS модификации относят повышенное сродство к белкам плазмы, что улучшает фармакокинетические свойства олигонуклеотидов, облегчая их клеточное поглощение и биораспределение. Несмотря на ряд преимуществ, PS-олигонуклеотиды обладают и недостатками, включая ограниченную эффективность и специфичность связывания с РНК-мишенями, сниженную способность рекрутировать РНКазу Н1 по сравнению с немодифицированными аналогами, а также сравнительно высокую токсичность, обусловленную неспецифическими взаимодействиями с клеточными белками [109,110]. Тем не менее, несмотря на указанные ограничения, в настоящее время PS-модификацию широко используют в составе антисмысловых препаратов, одобренных для клинического применения.

Помимо PS-аналогов, к модификациям фосфатной группы, поддерживающим активность РНКазы Н1, относят также фосфородитиоатную (SPS) [111,112], боранфосфатную (BP) [113–115], фосфоацетатную (AcPO) [116] и тиофосфоацетатную (AcPS) [116] модификации, которые повышают устойчивость олигонуклеотидов к действию нуклеаз, однако, связываются с комплементарной РНК с более низкой эффективностью, чем немодифицированные аналоги (Рис. 2 А, Таблица 1). Среди модификаций фосфатной группы следует также выделить 5'-О-метилфосфонатные (5'-MEP) [117], 5'-гидроксифосфонатные (5'-HP) [117] и фосфоформатные (PF) [118] модификации, введение которых приводит к повышению термостабильности дуплекса по сравнению с немодифицированными аналогами (Рис. 2 А, Таблица 1).

На сегодняшний день наиболее новой модификацией фосфатной группы, не препятствующей активности РНКазы Н1, является метилсульфонил фосфорамидатная (μ) (Рис. 2 А). В зависимости от длины и типа РНК-мишени (мРНК или миРНК), олигонуклеотиды с μ -модификацией демонстрировали сопоставимую или чуть более низкую эффективность связывания с РНК в сравнении с ДНК-аналогами. Следует отметить, что полностью μ -модифицированные олигонуклеотиды обладают исключительно высокой

нуклеазоустойчивостью, превосходя по стабильности PS-аналоги [32,119–121] (Рис. 2 А, Таблица 1).

Таблица 1. Характеристики химических модификаций олигонуклеотидов, поддерживающих активность РНКазы H1.

Модификация	Устойчивость к нуклеазам ¹	Стабильность дуплекса ²	Исследования в биологических системах	Ссылки
Фосфоротиоатная (PS)	+	–	Клеточные культуры / <i>in vivo</i>	[109,122]
Фосфородитиоатная (SPS)	+++	–	н.д.	[111,112]
Боранфосфатная (BP)	++	–	н.д.	[113–115]
Фосфоацетатная (AcPO)	+++	–	н.д.	[116]
Тиофосфоацетатная (AcPS)	+++	–	н.д.	[116]
5'-О-метиленфосфонатная (5'-MEP)	н.д.	+	н.д.	[117]
5'-гидроксифосфонатная (5'-HP)	н.д.	+	н.д.	[117]
Фосфоформатная (PF)	+++	+	н.д.	[118]
Метилсульфонил фосфорамидатная (μ)	+++	–	Клеточные культуры / <i>in vivo</i>	[25,26,32,119,121]
Арабинонуклеиновая кислота (ANA)	+	–	н.д.	[123,124]
2'-дезоксидеокси-2'-фторо-β-D-арабинонуклеиновая кислота (FANA)	++	+	Клеточные культуры / <i>in vivo</i>	[124–130]
2'-дезоксидеокси-2'-фторо-3'-С-гидроксиметил-β-D-лигсопиримидиновые нуклеотиды (U/C)	+	+	Клеточные культуры	[131]
2'-β-фторо-трициклические арабинонуклеотиды (2'-F-tc-ANA)	н.д.	+	н.д.	[132]
6'-фторо[4.3.0]бициклические нуклеотиды (6'-F-bc4,3-DNA)	н.д.	--	н.д.	[133]
6'-дифторо[4.3.0]бициклические нуклеотиды (6'-diF-bc4,3-DNA)	н.д.	--	н.д.	[134]
4'-С-аминоэтокси- тимидин (AEoT)	+++	+	Клеточные культуры	[135]
4'-С-2-аминопропокси тимидин (4'-(S)-2-APoT и 4'-(R)-2-APoT)	+++	–	н.д.	[136]
Циклогексенильная нуклеиновая кислота (CeNA)	+++	+	н.д.	[137,138]
С5-пропинил-арабиноуридин (araU ^P) и -арабиноцитидин (araC ^P)	+++	+	н.д.	[139]

¹ Оценка устойчивости модифицированных олигонуклеотидов к действию нуклеаз условно представлена как умеренная, повышенная или высокая, что обозначено символами +, ++, или +++, соответственно. ² Стабильность гетеродуплекса модифицированного АСО с РНК: "–" обозначает снижение температуры плавления (Tm) менее чем на 3 °С на одну модификацию, "–" – снижение до 5 °С, "+" обозначает повышение Tm. н.д. – нет данных.

Как правило, большинство химических модификаций сахарного остова и азотистых оснований не поддерживают активность РНКазы H1. Однако известен ряд модификаций рибозы и аналогов оснований, которые при соблюдении определенных условий включения в структуру

олигонуклеотида не препятствуют взаимодействию фермента с образующимся гетеродуплексом. Наиболее известными примерами модификаций рибозы по 2'-положению, не ингибирующими активность РНКазы Н1, являются производные арабинонуклеиновой кислоты (ANA) [123,124], которые повышают аффинность олигонуклеотида к комплементарной РНК и увеличивают устойчивость к действию нуклеаз по сравнению с немодифицированными аналогами. К таким модификациям относят 2'-дезоксидезокси-2'-фторо-β-D-арабинонуклеиновую кислоту (FANA) [124,125,130], а также 2'-дезоксидезокси-2'-фторо-3'-С-гидроксиметил-β-D-лигсо пиримидиновые нуклеотиды (U/C) [131] (Рис. 2 А, Таблица 1). Несмотря на то, что полностью FANA-модифицированные олигонуклеотиды не поддерживают активность РНКазы Н1, использование этой модификации в химерных PS-олигонуклеотидах с чередующимися FANA- и ДНК-нуклеотидами, либо в олигонуклеотидах, содержащих центральный ДНК-участок и фланкирующие области с FANA, обеспечивает эффективное расщепление РНК-мишени под действием РНКазы Н1, сопоставимое с активностью PS-олигонуклеотидов [125]. Кроме того, отличительной особенностью FANA является способность самостоятельно проникать в клетки без использования систем доставки [140]. Введение модифицированных нуклеотидов с пропилильной группой в С5-положении арабиноуридина или арабиноцитидина (araU^P и araC^P) в центральную область олигонуклеотида, фланкированную ДНК- или 2'-О-МОЕ-нуклеотидами (2'-О-(2-метоксиэтил)), также обеспечивает сохранение способности гетеродуплексов с такими производными АСО активировать РНКазу Н1 [139] (Рис. 2 А, Таблица 1).

Активно разрабатываются аналоги нуклеотидов, содержащие атом фтора в различных положениях сахарного остова трициклической и бициклической структуры – 2'-β-фторо-трициклические арабинонуклеотиды (2'-F-тс-ANA) [132], 6'-фторо[4.3.0]бициклические нуклеотиды (6'-F-бс4,3-DNA) [133], 6'-дифторо[4.3.0]бициклические нуклеотиды (6'-diF-бс4,3-DNA) [134] (Рис. 2 А, Таблица 1). Было показано, что олигонуклеотиды, содержащие 5 последовательно расположенных модифицированных нуклеотидов, фланкированных ДНК-нуклеотидами, поддерживают РНКазы-Н1-зависимое расщепление химерной 2'-О-метил РНК (2'-ОМе), содержащей рибонуклеотиды напротив модифицированной области [134].

Среди аналогов нуклеотидов, не препятствующих активности РНКазы Н1 при точечном введении в олигонуклеотид и повышающих стабильность соединения в сыворотке, можно выделить модификации дезоксирибозы по 4'-положению, такие как 4'-С-аминоэтокси тимидин (АЕоТ) [135] и 4'-С-2-аминопропокси тимидин в *S*- или *R*-конфигурации (4'-(*S*)-2-АРоТ и 4'-(*R*)-2-АРоТ) [136], а также аналоги нуклеотидов с 6-членным кольцом, например, циклогексенильная нуклеиновая кислота (СеNA) [137,138,141] (Рис. 2 А, Таблица 1).

Несмотря на большое разнообразие химических модификаций, способных рекрутировать РНКазу Н1, в настоящее время лишь ограниченное их число применяется для создания АСО,

предназначенных для подавления РНК-мишеней в биологических системах *in vitro* и *in vivo* (Таблица 1). Как уже отмечалось выше, наибольшее распространение получила PS модификация, которую используют в структуре практически всех клинически одобренных АСО, рекрутирующих РНКазу Н1, и которая является золотым стандартом в данной области [57,70]. Среди недавно разработанных перспективных аналогов следует выделить метилсульфонил фосфорамидатные модификации, которые продемонстрировали высокую эффективность в подавлении уровня как мРНК [119,121], так и онкогенных днкРНК [142] и миРНК, включая успешное применение на опухолевых моделях на мышах [25,26,32]. Значительный интерес также представляет FANA модификация, которую активно используют для введения в концевые области ДНК-олигонуклеотидов и успешно применяют для подавления терапевтически значимых мишеней *in vitro* и *in vivo* [125–129,140]. Эти модификации не только обеспечивают нуклеазоустойчивость и рекрутинг РНКазы Н1, но также способствуют проникновению олигонуклеотида в клетки без трансфицирующих агентов. Среди недавно разработанных аналогов рибозы лишь для олигонуклеотидов с 2'-дезоксидезокси-2'-фторо-3'-С-гидроксиметил-β-D-лихсо-модифицированными нуклеотидами и АЕоТ была показана способность подавлять экспрессию мРНК-мишеней [131,135]. Несмотря на то, что изучение других модификаций, способных рекрутировать РНКазу Н1, ограничено лишь исследованиями их физико-химических свойств, данные модификации могут найти применение для разработки АСО нового поколения.

Наиболее распространенным и широко изученным структурным типом АСО, способным активировать РНКазу Н1, являются гапмеры. Гапмеры представляют собой химерные олигонуклеотиды, которые содержат центральный блок (6 – 10 н.), состоящий из мономеров дезоксирибонуклеотидов или фосфоротиоатных нуклеотидов, способных индуцировать расщепление РНКазой Н1, и 5'- и 3'-фланкирующие фрагменты, содержащие модифицированные нуклеотиды (2 – 5 н.), такие как 2'-О-МОЕ, 2'-ОМе), замкнутая нуклеиновая кислота (LNA, от англ. locked nucleic acids), 2',4'-ограниченная 2'-О-этил нуклеиновая кислота (сEt, от англ. constrained Ethyl nucleic acids) или модификации, которые не распознаются РНКазой Н1, но повышают эффективность связывания АСО с РНК и, в ряде случаев, дополнительно увеличивают их нуклеазную стабильность (Рис. 2. В) [70,90].

Благодаря оптимальному сочетанию высокой аффинности к мишени, нуклеазоустойчивости и способности активировать РНКазу Н1, гапмерная структура олигонуклеотидов стала основной терапевтической стратегией в области антисмысловой технологии. В настоящее время ведутся активные исследования, направленные на усовершенствование структуры гапмеров, в частности, установление оптимальной длины центрального блока и подбор состава модификаций фланкирующих областей, для повышения эффективности терапевтического действия.

1.1.2.3. Терапевтическое применение антисмысловых олигонуклеотидов, функциональная активность которых реализуется за счет действия РНКазы Н1

В современной науке наблюдается значительный интерес к изучению антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на подавление терапевтически значимых РНК-мишеней. Среди антисмысловых конструкций, использующих активность РНКазы Н1, исследователи отдают явное предпочтение структурам гапмерного типа, которые составляют подавляющее большинство клинически одобренных антисмысловых препаратов и соединений, находящихся в клинических испытаниях. Такой дизайн стал практически универсальным подходом при разработке РНКазы Н1-зависимых терапевтических агентов, направленных на подавление широкого спектра РНК-мишеней, включая белок-кодирующие мРНК и различные типы некодирующих РНК.

РНКазы Н1-активирующие АСО широко используют для подавления белок-кодирующих мРНК, ассоциированных с наследственными заболеваниями, и в настоящее время это направление характеризуется наибольшей степенью клинической реализации в области терапевтического применения олигонуклеотидов. На данный момент ряд таких препаратов уже одобрили для клинического применения, включая 2'-О-МОЕ-гапмеры (Рис. 2 Б), направленные к мРНК аполипопротеина В-100 (*ApoB-100*) для лечения гомозиготной семейной гиперхолестеринемии (*mipomersen*), мРНК транстиретина (*TTR*) при наследственном транстиериновом амилоидозе (*inotersen* и *eplontersen*), мРНК аполипопротеина СIII (*Apo-CIII*) для терапии семейного синдрома хиломикронемии (*volanesorsen* и *olezarsen*) и мРНК супероксиддисмутазы-1 (*SOD1*) для лечения бокового амиотрофического склероза (*tofersen*) [143–148].

мРНК-направленные олигонуклеотиды гапмерного типа также показали высокую эффективность в отношении широкого спектра вирусных инфекций. LNA-гапмеры продемонстрировали эффективное подавление репликации различных вирусов путем воздействия на критически значимые области: внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) в случае вируса гепатита С [149], ген хозяина Niemann-Pick C1 (*NPC1*) в случае вируса Эболы [150,151] и 3'-нетранслируемая область (3'-UTR) вирусной РНК при инфицировании вирусом японского энцефалита [152]. FANA-гапмеры, направленные к высоко консервативным участкам генома вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-1) (U5, *tat/rev*, и сайт инициации димеризации (DIS)), показали высокую эффективность при подавлении экспрессии вирусной РНК в первичных клетках человека [126]. В связи с глобальной пандемией COVID-19 в последние годы стремительное развитие получила разработка антисмысловых гапмерных олигонуклеотидов, направленных на различные области РНК коронавируса тяжелого острого респираторного

синдрома 2 (SARS-CoV-2). Исследования продемонстрировали эффективность различных типов гапмеров, включая LNA- и cEt-гапмеры, в ингибировании репликации вируса *in vitro* и *in vivo* [153–156].

В последнее время спектр терапевтических мишеней для антисмысловой терапии значительно расширился. Помимо традиционных кодирующих мРНК, все большее внимание исследователи уделяют классам некодирующих молекул РНК, в частности тем, которые участвуют в процессах онкогенеза. Так, был разработан LNA-гапмер, направленный на первичный транскрипт кластера миРНК-17-92 [157], и 2'-O-МОЕ гапмер, конъюгированный с токоферолом, для подавления пре-миРНК MIR17HG [158]. Одним из немногих примеров эффективного применения олигонуклеотидов не химерной и не гапмерной структуры являются полностью модифицированные метилсульфонил фосфорамидатные АСО, которые показали высокую эффективность при ингибировании зрелых онкогенных миРНК миРНК-21, миРНК-17 и миРНК-155 [25,26]. Исследователи также создали LNA-гапмеры для подавления кольцевых РНК путем связывания их уникальной последовательности участка бэксплайсинга (от англ. backsplice-junction sequence) [159], а также для подавления рiРНК рiR-32877 [7]. В отношении днкРНК примерами служат LNA-гапмеры, разработанные для подавления экспрессии PURPL при гепатоцеллюлярной карциноме [160] и PVT1 при плоскоклеточном раке кожи [161], а также cEt- и LNA-гапмеры, направленных к днкРНК MALAT1 [162,163]. Применение РНКазы H1-активирующих АСО, направленных к некодирующим РНК, вызывало подавление пролиферации и миграции опухолевых клеток, индукцию апоптоза *in vitro* [7,25,26,157–163], а также ингибирование роста и метастазирования опухолей *in vivo* [25,26,157,158,161–163].

1.2. РНКазы Р-опосредованное ингибирование РНК с использованием внешних направляющих последовательностей (EGS)

Перспективным подходом генной терапии на основе нуклеиновых кислот является использование рибонуклеазной активности эндогенного фермента РНКазы Р. РНКазы Р человека представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из каталитического РНК-компонента (H1 РНК) и вспомогательного белкового компонента (Рис. 3 А). Фермент играет ключевую роль в процессинге транспортных РНК (тРНК), осуществляя специфическое расщепление 5'-лидерной последовательности предшественников тРНК (пре-тРНК) (Рис. 3 Б) [55,164,165]. Для селективного подавления экспрессии генов с привлечением активности эндогенной РНКазы Р используют внешнюю направляющую последовательность (EGS, от англ. external guide sequence), которая представляет собой короткую синтетическую РНК длиной около 50 н., имитирующую фрагмент пре-тРНК [166,167] (Рис. 3 В). Данная молекула включает две принципиально важные структурные области: консервативную область, которая моделирует

топологию пре-тРНК, распознаваемую РНКазой Р, и специфическую область для комплементарного связывания целевой мРНК. Терапевтическое действие реализуется через формирование комплекса между EGS и мРНК-мишенью, который структурно имитирует природный субстрат РНКазы Р, что приводит к специфическому расщеплению мРНК-мишени ферментом и снижению уровня ее экспрессии.

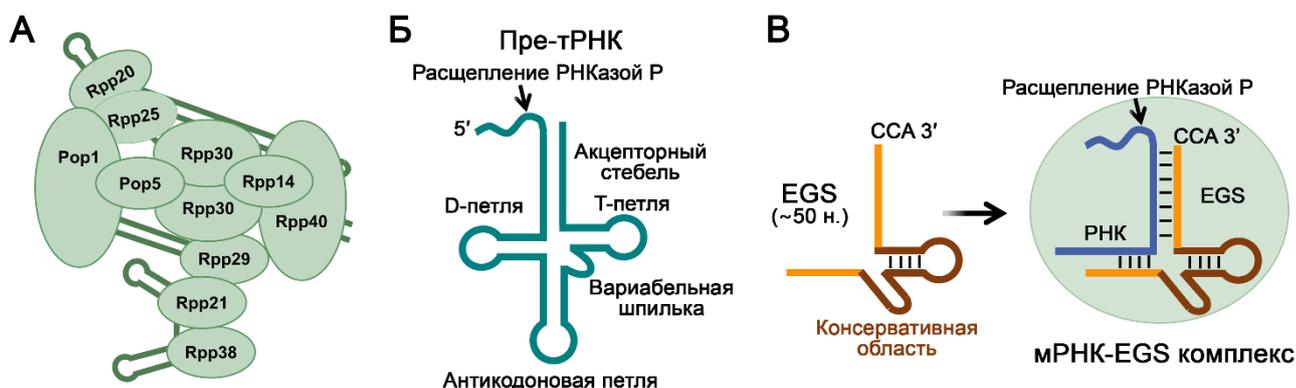


Рис. 3. Структурные и функциональные особенности РНКазы Р-опосредованного расщепления РНК-мишени с использованием внешней направляющей последовательности (EGS). **А** – структурная организация РНКазы Р человека, состоящей из каталитического РНК компонента (H1 РНК) (зеленая линия) и десяти вспомогательных белковых субъединиц (зеленые овалы). **Б** – структура пре-тРНК, являющейся субстратом РНКазы Р. **В** – комплекс EGS и мРНК-мишени, который структурно имитирует пре-тРНК и, как следствие, специфически распознается и расщепляется РНКазой Р.

Впервые применение EGS-РНКазы Р технологии для селективного подавления экспрессии генов было продемонстрировано в лаборатории С. Альтмана [166,167]. Первые эксперименты были сфокусированы преимущественно на бактериальных системах и показали, что EGS конструкции способны эффективно ингибировать экспрессию жизненно важных генов и нарушать жизнеспособность ряда клинически значимых патогенов, включая *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, а также простейшего паразита *Plasmodium falciparum*, являющегося возбудителем тяжёлой формы малярии [168,169]. В настоящее время исследователи продолжают разрабатывать EGS для терапевтического применения. В недавнем исследовании антибактериальный потенциал EGS был подтверждён для подавления роста бактерии *Acinetobacter baumannii*, вызывающей тяжелые внутрибольничные инфекции. В этой работе ДНК-EGS и 2'-OMe-EGS-олигонуклеотиды, конъюгированные с олиго(N-метил-пирролом), самостоятельно проникали в клетки бактерий и осуществляли эффективное расщепление мРНК генов домашнего хозяйства *ftsZ* и *gyrA* под действием РНКазы Р [170]. EGS технологию также широко применяют и для ингибирования экспрессии генов вирусов человека, таких как вирус гриппа, цитомегаловирус человека (HCMV), вирус простого герпеса первого и второго типа (HSV-1, HSV-2), вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус гепатита В (HBV) и герпесвирус, ассоциированный с

саркомой Капоши, что подробно описано в обзоре [169]. В недавних исследованиях было продемонстрировано применение EGS для подавления критически значимых транскриптов вирусов, в частности, мРНК основного капсидного белка (*MCP*) цитомегаловируса человека [171], мРНК, кодирующей оцДНК-связывающий белок HSV-2 *ICP8*, необходимый для репликации вируса HSV-2 [172], а также мРНК *CCR5*, кодирующей корецептор, необходимый для проникновения вируса HIV в клетку [173]. Разработанные EGS конструкции продемонстрировали высокую эффективность, обеспечивая снижение уровня целевых белков до 98% и подавление вирусной репликации на несколько порядков. Так, экспрессия *MCP* в клетках, инфицированных HCMV, снижалась на 98%, а вирусный титр уменьшался в 10 000 раз [171]; использование EGS, направленных к мРНК *ICP8* вируса HSV-2, приводило к специфическому снижению уровня белка на 85% и ингибированию репликации вируса в 3 тысячи раз [172]; EGS, направленные к *CCR5* HIV, способствовали подавлению уровня мРНК на 98% и снижению внутриклеточного уровня РНК HIV более чем в 900 раз *in vitro* [173].

1.3. Белки семейства Argonaute для ингибирования РНК-мишени

Белки семейства Argonaute играют ключевую роль в регуляции генов посредством РНК-интерференции с вовлечением малых РНК в составе RISC. Эти белки обнаружены практически у всех представителей эукариот, а также у бактерий и архей [174]. Объединяющим структурным элементом всех белков данного семейства является каталитический PIWI домен, обеспечивающий эндонуклеазную активность. На основе идентичности последовательностей семейство белков Argonaute эукариот подразделяют на два подсемейства: AGO и PIWI [175]. Белки подсемейства AGO повсеместно экспрессируются в большинстве типов тканей и взаимодействуют с миРНК и siРНК, принимая участие в посттранскрипционной регуляции генов. В свою очередь, белки подсемейства PIWI, которые преимущественно экспрессируются в герминативных клетках, связываются с PIWI-взаимодействующими РНК (piРНК) и участвуют в подавлении активности транспозонов.

1.3.1. Структура, механизм действия и основные функции белков AGO

У человека в подсемейство белков AGO входит четыре паралога с 80%-ной гомологией аминокислотных последовательностей: AGO1, AGO2, AGO3 и AGO4. Белки AGO характеризуются высокой консервативностью структуры и состоят из четырех основных доменов: N-, PAZ -, MID- и PIWI [176] (Рис. 4 А). N-домен (от англ. amino-terminal domain) распознаёт миРНК или siРНК дуплекс и инициирует расхождение ведущей и пассажирской цепей РНК-дуплекса, сопровождающееся сборкой комплекса RISC. Далее белок AGO осуществляет закрепление направляющей цепи РНК путём специфического связывания 3'-конца малой РНК PAZ-доменом (от англ. PIWI-Argonaute-Zwille domain) и фиксированием 5'-фосфата MID-

доменом (от англ. Middle domain) (Рис. 4 А, Б). С-концевой PIWI-домен структурно схож с каталитическим доменом РНКазы H и играет ключевую роль в разрезании целевой мРНК, комплементарной малой РНК. В PIWI-домене выделяют два субдомена: PIWI-каталитический и PIWI-хеликазный (Рис. 4 А). PIWI-хеликазный субдомен совместно с MID доменом образуют составной сайт связывания для 5'-монофосфата направляющей цепи РНК (Рис. 4 А и Б). N- и PAZ-домены, а также PAZ- и MID-домены соединены линкерами L1 и L2, обеспечивающими структурную стабильность комплекса RISC (Рис. 4 А). Кроме того, в составе белков AGO непосредственно перед N-доменом дополнительно выделяют неструктурированную N-концевую область, которая обеспечивает структурную стабильность AGO путём соединения N-домена с линкерами L1, L2 и PIWI-доменом [176–178]. Белки AGO1, AGO3 и AGO4 содержат в своем составе уникальные структурные элементы, такие как консервативный сегмент 7, AGO3-специфичную инсерцию и AGO4-специфичную инсерцию, соответственно, которые участвуют в распознавании мишени или связывании с направляющей РНК. Белки AGO2 и AGO3 имеют одинаковую каталитическую тетраду аминокислотных остатков в составе PIWI-домена – DEDH, тогда как у белков AGO1 и AGO4 она представлена аминокислотами DEDR и DEGR, соответственно (Рис. 4 А) [176].

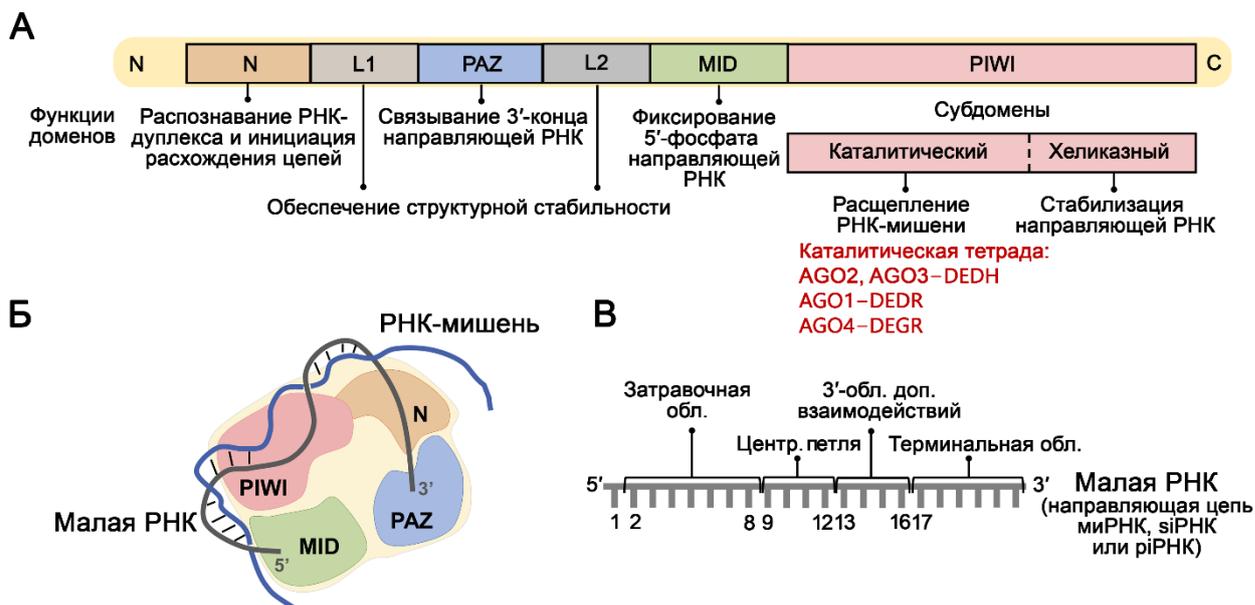


Рис. 4. Доменная организация и функциональная структура белков семейства AGO человека. **А** – схематическое изображение доменной организации белков семейства AGO с описанием основных функций доменов. **Б** – модель взаимодействия белка AGO с малой РНК и РНК-мишенью. **В** – функциональные области направляющей цепи малой РНК при её включении в белок AGO.

В научной литературе преобладает мнение, что миРНК включаются в один из четырех паралогов AGO случайным образом в зависимости от профиля экспрессии миРНК в клетке [176]. Однако существуют исследования, в которых продемонстрировано предпочтение определенных

миРНК к связыванию с конкретным белком AGO. Например, AGO2 связывается с миРНК-342-3р в 19 раз чаще, чем AGO3, тогда как AGO3 образует комплекс с миРНК-629-3р и миРНК-92b-3р в 15 и 12 раз эффективнее, чем AGO2, соответственно [176]. Также показано, что миРНК-3191-5р обнаруживается только в комплексе с AGO2 или AGO4 [179]. Тем не менее, на данный момент клеточные системы, регулирующие этот процесс, пока не выяснены.

При включении в AGO каждый нуклеотид направляющей цепи siРНК или миРНК в зависимости от его положения выполняет определенную функцию. В последовательности малой РНК выделяют пять функциональных областей, которые обеспечивают ее биологическую активность посредством координированного поэтапного функционирования: 5'-концевой нуклеотид, ассоциированный с MID доменом AGO и не участвующий в распознавании мишени; затравочная область (от англ. seed region, нуклеотиды 2 – 8); центральная петля (от англ. central region; нуклеотиды 9 – 12); 3'-область дополнительных взаимодействий (от англ. 3'-supplementary region; нуклеотиды 13 – 16); и 3'-терминальная область (от англ. terminal region; нуклеотиды 17 – 23), 3'-концевой нуклеотид которой закреплен в PAZ домене белка AGO (Рис. 4 В) [180–182]. Затравочная область и 3'-область дополнительных взаимодействий являются ключевыми для обеспечения распознавания и связывания миРНК с мРНК-мишенью (Рис. 4 Б и В). После формирования комплекса центральная петля и терминальная область миРНК способствуют его конформационной перестройке, что индуцирует эффективную инактивацию мРНК-мишеней [178,180,183–185]. После формирования компетентной к расщеплению конформации дуплекса миРНК/мРНК AGO осуществляет расщепление мРНК-мишени напротив связи, расположенной между 10 и 11 нуклеотидом миРНК. Для осуществления каталитической активности AGO необходимо присутствие двухвалентных ионов металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) [186,187].

В 2004 году двумя группами исследователей было показано, что несмотря на то, что AGO2 и AGO3 имеет одинаковую каталитическую тетраду DEDH, только AGO2 способен осуществлять расщепление мРНК-мишени [188,189]. В 2017 году М.С. Пак с коллегами показали, что AGO3 человека также способен проявлять нуклеазную активность, но лишь в комплексе с определёнными миРНК. Например, при загрузке миРНК-20a в комплекс с AGO3, белок расщеплял комплементарную мишень, однако с более низкой скоростью, чем AGO2 [190]. Позже было обнаружено, что AGO3 человека способен проявлять нуклеазную активность при загрузке определёнными туРНК (от англ. tiny RNA), осуществляющими регуляцию генов и защиту генома от мобильных генетических элементов [191]. Общеизвестно, что AGO1 не способен разрезать РНК-мишени [192,193], однако Б. Ван с коллегами продемонстрировали способность AGO1 расщеплять пассажирскую цепь РНК во время сборки RISC [194].

Белки AGO локализуются не только в цитоплазме, но и в ядре, где они могут выполнять дополнительные неканонические функции, такие как регуляция транскрипции через

взаимодействие с РНК-полимеразой II или малыми РНК, координирование альтернативного сплайсинга путем метилирования гистонов, а также поддержание целостности генома путем участия в репарации дц разрывов ДНК [195,196].

1.3.2. AGO-опосредованное ингибирование РНК с использованием одноцепочечных олигонуклеотидов

В настоящее время подходы, основанные на использовании механизма РНК-интерференции, опосредованной белками семейства AGO, представляют собой быстро развивающееся направление терапевтических исследований для лечения широкого спектра заболеваний человека. Специфичность функционирования комплекса RISC определяется малыми некодирующими РНК, такими как siРНК и miРНК. siРНК представляют собой двуцепочечные молекулы РНК длиной 20 – 25 н., которые являются эволюционно консервативным элементом антивирусной защиты у широкого спектра эукариотических организмов [197,198]. miРНК представляют собой эндогенно экспрессируемые некодирующие молекулы РНК длиной 20 – 23 н., которые вовлечены в регуляцию экспрессии генов, контролирующих ключевые биологические процессы в клетке, такие как дифференцировка, пролиферация, апоптоз и другие [9]. Несмотря на различия в происхождении и функциях, биогенез siРНК и miРНК протекает по сходному механизму, который включает пошаговый каталитический процессинг длинных шпилечных предшественников, в результате которого образуются короткие двуцепочечные молекулы siРНК или miРНК (подробнее процесс описан на Рис. 5) [199]. Завершающим этапом их созревания является образование комплекса одноцепочечной направляющей РНК с белками семейства AGO, что приводит к сборке функционального RISC (Рис. 5 А). Посттранскрипционное подавление генов с участием miРНК может осуществляться несколькими различными механизмами – через эндонуклеотическое расщепление мРНК белком AGO2, и некаталитическим путем, включающим рекрутинг вспомогательных белков и приводящим к репрессии трансляции или деаденилированию с последующей деградацией мРНК (Рис. 5 Б и В) [183,185]. Основным требованием для AGO2-опосредованного расщепления мРНК является образование комплементарных пар оснований одновременно в затравочной области, центральной петле и в 3'-области дополнительных взаимодействий (Рис. 5 В I). Формирование мРНК/miРНК дуплекса только в затравочной области miРНК, а также наличие дополнительных комплементарных пар в 3'-области дополнительных взаимодействий инициирует рекрутирование комплексом RISC адапторного белка TNRC6 (семейства GW182), который привлекает геликазу DDX6, обеспечивающую подавление трансляции, а также деаденилазных комплексов PAN2-PAN3 и CCR4-NOT, способствующих укорочению поли(А)-хвоста мРНК, декэпированию и 5' → 3'

экзонуклеолитическую деградацию мРНК (Рис. 5 Б, В II) [185]. Протяженное спаривание оснований мРНК с 3'-терминальной областью миРНК в сочетании с миссмаッチами в центральной области инициирует внутренний процесс утилизации миРНК, называемый РНК-направленной деградацией миРНК или TDMD (от англ. Target RNA-Directed MicroRNA Decay), который приводит к деградации самой миРНК (Рис. 5 В III) [185,200–202]. В случае siРНК посттранскрипционная регуляция осуществляется за счет полного комплементарного связывания siРНК с целевой мРНК, которое приводит к расщеплению мишени белком AGO2 (Рис. 5 А). Благодаря полному комплементарному связыванию, siРНК обычно воздействуют на одну мРНК-мишень, тогда как миРНК образуют частично комплементарные комплексы с различными мРНК, регулируя экспрессию одновременно множества генов. Показано, что использование синтетических олигонуклеотидов, имитирующих эндогенные siРНК или миРНК, позволяет эффективно индуцировать РНК-интерференцию и представляет собой перспективное и быстро развивающееся направление генной терапии.

Первые научные исследования в области РНК-интерференции были сосредоточены на изучении возможностей канонических двуцепочечных синтетических siРНК, заложивших фундаментальную основу для разработки терапевтических препаратов, направленных на селективное подавление экспрессии генов посредством комплекса RISC. Позднее значимым научным результатом стало обнаружение способности одноцепочечных аналогов (оц-siРНК и оц-миРНК) эффективно подавлять экспрессию комплементарных мРНК-мишеней по механизму РНК-интерференции, что определило новое направление в разработке терапевтических подходов к генной регуляции, основанное на применении одноцепочечных малых РНК [203,204,213,205–212].

В. Лима и коллеги [214] показали, что аффинность ферментов Dicer и AGO2 к коротким одноцепочечным РНК сопоставима со сродством к классическим двуцепочечным siРНК. Формирование нуклеопротеиновых комплексов с участием таких одноцепочечных структур также приводит к эффективной инактивации мишеней по пути РНК-интерференции. Несмотря на то, что в большинстве случаев оц-siРНК проявляют более низкую или сходную эффективность подавления экспрессии генов-мишеней по сравнению с каноническими двуцепочечными аналогами, а также обладают более низкой стабильностью в биологической среде [207–210,213], применение одноцепочечных siРНК имеет ряд существенных преимуществ. К числу достоинств относят значительно более простой и экономически выгодный процесс производства, быстрое формирование функционально активного комплекса RISC за счёт сокращения этапов процессинга и загрузки, снижение вероятности возникновения побочных эффектов вследствие отсутствия пассажирской цепи и улучшенные фармакокинетические характеристики.

Ограничения, связанные со сниженной нуклеазоустойчивостью, могут быть решены путём рационального введения химических модификаций в последовательность цепи РНК.

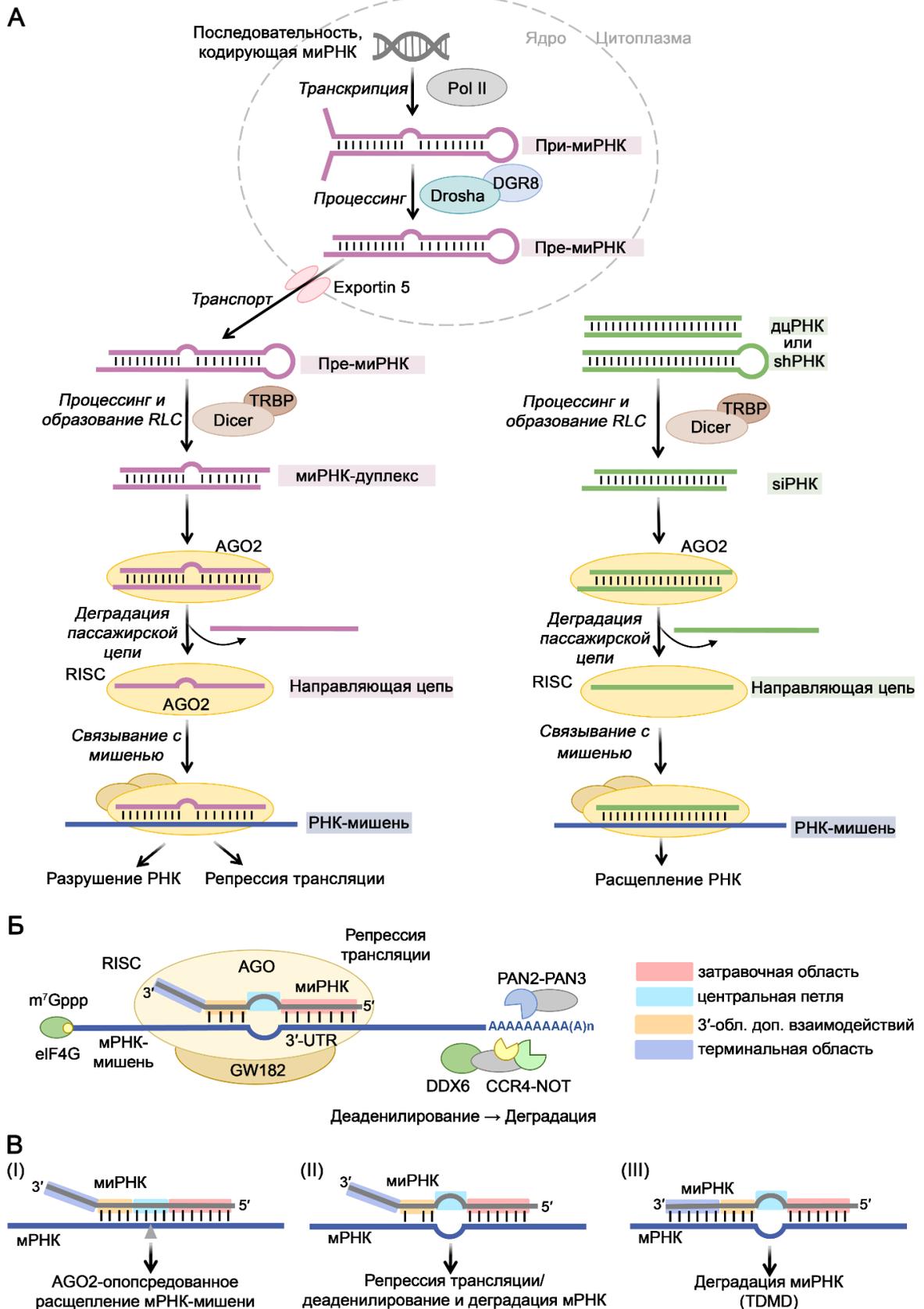


Рис. 5. Пути биогенеза миРНК и siРНК и механизмы миРНК-индуцируемого посттранскрипционного подавления генов. А – Биогенез миРНК и siРНК. Левая панель –

каноническая схема биогенеза миРНК. РНК-полимераза II (Pol II) синтезирует длинные транскрипты шпилечной структуры – первичные миРНК (при-миРНК). В ядре комплекс Drosha/DGCR8 расщепляет их до укороченных (60-70 н.) шпилечных РНК с выступающими динуклеотидными 3'-концами – предшественников миРНК (пре-миРНК), которые экспортируются в цитоплазму белком Exportin 5. Комплекс Dicer/TRBP процессирует пре-миРНК с образованием миРНК-дуплексов (21-23 н.) и с дальнейшим формированием РНК-загрузочного комплекса (RLC) в котором белки семейства AGO дифференцируют ведущую и пассажирскую цепи в дуплексе миРНК, инициируют плавление дуплекса, деградацию пассажирской цепи и сборку RISC. Сформированный RISC с направляющей цепью миРНК образует частично комплементарный комплекс с РНК-мишенью и запускает механизмы подавления экспрессии гена. Правая панель – путь образования siРНК. Двухцепочечная РНК (дцРНК) или короткая шпилечная РНК (shРНК), преимущественно вводимые экзогенно, а также эндогенно формирующиеся из вирусных РНК, расщепляется комплексом Dicer/TRBP с образованием дуплексов siРНК. Направляющая цепь загружается в AGO2-содержащий RISC, образует полностью комплементарный комплекс с мРНК-мишенью и индуцирует её расщепление. **Б** – взаимодействие миРНК-индуцируемого комплекса подавления генов miRISC с мРНК-мишенью. Посредством затравочной области и 3'-области дополнительных взаимодействий миРНК связывается с 3'-UTR мРНК с последующим вовлечением геликазы DDX6, а также деаденилазных комплексов PAN2-PAN3 и CCR4-NOT, что приводит к подавлению трансляции, дестабилизации и деградации мРНК. **В** – события, сопровождающие формирование миРНК/мРНК дуплексов, включающие AGO2-опосредованное расщепление мРНК (**I**), подавление трансляции, дестабилизацию и деградацию мРНК (**II**) или запуск процесса деградации самой миРНК (TDMD, от англ. Target RNA-Directed MicroRNA Decay) (**III**).

1.3.2.1. Одноцепочечные siРНК

Применение одноцепочечных siРНК (оц-siРНК) рассматривается как перспективная терапевтическая стратегия, которая объединяет положительные характеристики двух технологий, сочетая простоту и биологическую доступность одноцепочечных структур с уникальными преимуществами рекрутинга ферментативной активности RISC (Рис. 6).

Исследования в области разработки терапевтических оц-siRNA выявили, что для эффективного подавления мРНК-мишени структура оц-siRNA должна включать определенные химические элементы (Рис. 6 А–В). В частности, необходимым условием является наличие 5'-фосфата, обеспечивающего узнавание и связывание оц-siRNA ферментами AGO и Dicer. Наиболее эффективным является введение метаболически стабильных вариантов фосфатов, которые по конформации и стереохимии подобны природному фосфату. Важным параметром является введение динуклеотида AA на 3'-конец оц-siRNA. Наличие этого элемента не является критическим для взаимодействия с белком AGO2, однако, имеет определяющее значение для связывания с белком Dicer, который предположительно осуществляет транспорт молекулы к RISC [203]. С целью защиты оц-siРНК от деградации в биологических системах и улучшения её функциональных свойств исследователи используют оц-siРНК оптимизированного дизайна (Рис. 6 Б (1)), полученного путём введения в последовательность различных химических модификаций: (I) метаболически стабильного аналога 5'-фосфата – 5'-(Е)-винилфосфоната (5'-(Е)-VP) или 5'-метиленфосфоната, (II) 2'-О-МОЕ-модифицированного 5'-концевого нуклеотида

для защиты от 5'-экзонуклеаз, (III) чередующихся 2'-F и 2'-ОМе модификаций рибозы, не препятствующих расщепляющей способности AGO2, с фосфоротиоатными межнуклеотидными связями для защиты от эндонуклеаз и улучшения фармакокинетических свойств, (IV) 2'-О-МОЕ-модифицированного аденозиндинуклеотида на 3'-конце для защиты от 3'-экзонуклеаз, (V) липофильной модификации С16 для улучшения биораспределения в тканях (Рис. 6 Б (1), В).

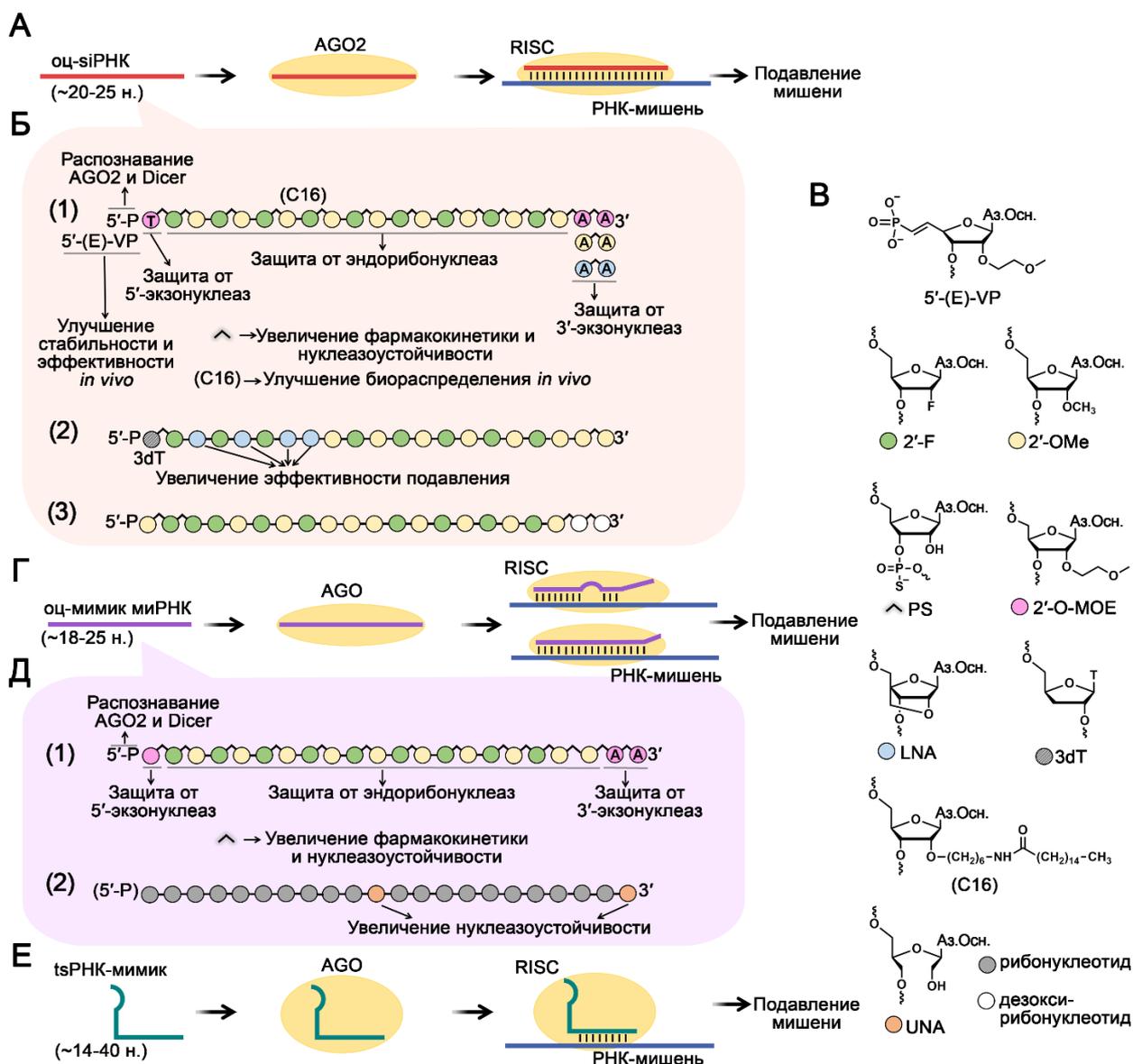


Рис. 6. AGO-опосредованное ингибирование РНК-мишеней с помощью синтетических одноцепочечных олигонуклеотидов. **А** – схема подавления РНК-мишени оц-siРНК с участием белка AGO2. **Б** – обобщенные оптимизированные структуры модифицированных оц-siРНК, используемые для подавления генов, представленные в работах [203–209] (1), [210] (2) и [211] (3). **В** – химические структуры модификаций, используемых в дизайне рассматриваемых одноцепочечных олигонуклеотидов. **Г** – схема подавления РНК-мишени оц-мимиком миРНК с участием белка AGO2. **Д** – типичные химически модифицированные структуры оц-мимиков миРНК, используемые для подавления генов в работах [213] (1) и [212] (2). **Е** – схема подавления РНК-мишени tsРНК с участием белков AGO. 5'-(E)-VP – 5'-(E)-винилфосфонат; 2'-F – 2'-фторрибоза; 2'-ОМе – 2'-О-метил; PS – фосфоротиоат; 2'-О-МОЕ – 2'-О-метоксиэтил; LNA –

замкнутая нуклеиновая кислота; 3dT – 3'-дезокситимидин; (C16) – липофильная модификация; UNA – разомкнутая нуклеиновая кислота; Аз.Осн. – азотистое основание.

С учётом указанных параметров конструирования, в ряде исследований, выполненных под руководством С. Крука и Д. Кори, была продемонстрирована высокая эффективность использования оц-siРНК для подавления различных молекулярных мишеней, включая метаболические регуляторы, такие как гомолог фосфатазы и тензина *P TEN*, фактор свертывания крови VII и аполипротеин СIII (*ApoCIII*) в гепатоцитах, а также мутантный ген *HTT*, ассоциированный с болезнью Хантингтона (Рис. 6 Б (1), В) [203–206]. Использование модифицированной структуры оц-siРНК позволило повысить эффективность подавления мРНК мишеней в 20 раз по сравнению с немодифицированными аналогами, а также увеличить период полувыведения соединений из тканей до 10 дней и обеспечить продление их действия на мышинных моделях до недели [203].

В рамках применения на моделях нейродегенеративных заболеваний, внутрижелудочковая инфузия оц-siРНК способствовала селективному подавлению мутантного аллеля *HTT* по всему мозгу, а конструкции, направленные к мРНК *ApoCIII* эффективно снижали уровни триглицеридов и холестерина ЛПНП в моделях метаболических нарушений [204–206]. На основе базового дизайна оц-siРНК исследователи вводили ряд дополнительных модификаций. Так, конъюгирование оц-siРНК с липофильной линейной углеродной цепью C16 значительно повышало проникновение соединений в клетки и их распределение по тканям (Рис. 6 Б (1), В) [37,203,206]. Введение нескольких миссмапчей в центральную область оц-siРНК в положениях 9 и 11 или 9 и 14 приводило к формированию миРНК-подобного дуплекса, повышая специфичность к мутантному аллелю [205]. Дальнейшая оптимизация 5'-концевой области оц-siРНК показала, что наиболее оптимальной является замена природного 5'-фосфата на 5'-(Е)-винилфосфонат в транс ориентации, которая одновременно обеспечивает метаболическую стабильность оц-siРНК и сохраняет ее способность рекрутировать AGO2 (Рис. 6 Б (1), В) [203–206]. Совокупность проведенных усовершенствований позволила рассматривать оц-siRNA как перспективную платформу для разработки терапевтических средств направленного подавления генов.

Модифицированные оц-siРНК продемонстрировали высокий терапевтический потенциал при нацеливании на патологические экспансии повторов, ассоциированные с неврологическими и офтальмологическими заболеваниями (Рис. 6 Б (1), В). Эти соединения эффективно распознавали мутантную форму гена *c9orf72*, содержащую патологически увеличенное число гексануклеотидных повторов GGGGCC, связанных с развитием бокового амиотрофического склероза и лобно-височной деменции [207]. Было показано, что оц-siРНК, полностью комплементарные соответствующим транскриптам повторов, эффективно ингибируют

мутантные РНК в фибробластах пациентов. Оц-siРНК с аналогичным дизайном были успешно применены и для нацеливания на экспансированные CUG-повторы в гене *TCF4*, ассоциированные с эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса, что приводило к значительному снижению количества патологической РНК в клетках. При этом эффективность таких конструкций была сопоставима с действием LNA-модифицированных стерически блокирующих АСО. [209]. В этом исследовании полностью комплементарные оц-siРНК проявляли более высокую активность, чем варианты с миссмапчами, что подчёркивает важность оптимальной степени комплементарности при взаимодействии с мРНК-мишенью. Примечательно, что в двух рассмотренных моделях оц-siРНК проявляли ингибирующую активность, сопоставимую или превышающую эффективность двуцепочечных аналогов siРНК, направленных к тем же повторяющимся участкам [207,209].

Модификации терминальной области оц-siРНК оказывают влияние на взаимодействие с белками AGO и их активность. Было показано, что замена традиционных двух 2'-МОЕ-аденозинов на 2'-ОМе- или LNA-аденозины на 3'-конце последовательности может значительно увеличивать эффективность ингибирующего действия оц-siRNA на специфические мишени (Рис. 6 Б (1), В) [208]. Оц-siРНК с 2'-ОМе-модифицированным 3'-диаденозином ингибировали мРНК гена *ADAM33*, ассоциированного с астмой, с эффективностью, сравнимой с дц-siRNA и 2.5-кратно превышающей действие других аналогов в фибробластах легких. В то же время, оц-siРНК, содержащая 3'-LNA модификации, обеспечивала более высокую эффективность подавления мРНК гена прогестеронового рецептора PR в клетках рака молочной железы. Эти результаты указывают на наличие вероятной зависимости активности оц-siРНК определённого дизайна от последовательности мишени.

Оптимизация 5'-области за счёт введения 3'-дезокситимидина (3dT) в первую позицию повышала эффективность включения в комплекс RISC в сравнении с использованием традиционных 2'-ОМе-урацил модификаций (Рис. 6 Б (2), В) [210]. Комбинация 3dT в первой позиции и введение LNA-модифицированных нуклеотидов в затравочной области оц-siРНК в положениях 3, 5 и 7 обеспечивала 60-кратное увеличение эффективности подавления мРНК β-катенина *CTNWB1* по сравнению с традиционной оц-siРНК в клетках печени мыши, что было сопоставимо с действием дц-siРНК. При доставке 5'-модифицированной оц-siRNA с помощью липидных наночастиц было продемонстрировано значительное подавление мишени в печени мышей *in vivo*, лишь незначительно уступающее эффективности дц-siРНК [210].

Модифицированные оц-siРНК продемонстрировали терапевтический потенциал и в контексте борьбы с инфекционными заболеваниями. Была разработана система доставки на основе нейтральных цитидиниловых и катионных липидов DNCA/CLD для эффективного транспорта оц-siРНК, направленной к мРНК гена X вируса гепатита В, в клетки [211].

Оптимизированные оц-siРНК, содержащие чередующиеся 2'-F и 2'-ОМе модификации нуклеотидов с фосфоротиоатными межнуклеотидными связями терминальных нуклеотидов и 5'-концевой природный фосфат (Рис. 6 Б (3), В), способствовали 80%-ному AGO2-зависимому подавлению мРНК-мишени в инфицированных клетках, вдвое превышая эффект немодифицированных олигонуклеотидов. Исследование биораспределения *in vivo* выявило, что оц-siРНК являются менее стабильными, чем дц-siРНК [211]. Для лечения криптоспориоза была предложена стратегия, основанная на введении оц-siРНК, направленных на подавление экспрессии гена нуклеозиддифосфаткиназы (NDK), в составе предварительно сформированных комплексов с белком AGO2, поскольку у паразитов рода *Cryptosporidium* отсутствуют ферменты интерферирующей машины RISC [215]. Применение такой искусственно созданной минимальной системы РНК-интерференции приводило к снижению паразитарной нагрузки в культуре эпителиальных клеток кишечника человека *in vitro*, а также к элиминации паразита на модели мышей *in vivo*.

1.3.2.2. Одноцепочечные мимики миРНК

Перспективным терапевтическим направлением, использующим в качестве ингибиторов короткие одноцепочечные РНК, является разработка одноцепочечных мимиков миРНК, имитирующих зрелую миРНК, которая, взаимодействуя с белком AGO2, способствует подавлению экспрессии генов-мишеней через эндогенный путь РНК-интерференции [212,213] (Рис. 6 Г). Доминирующим подходом в области восстановления сниженного или утраченного вследствие патологических процессов уровня миРНК, является применение дуплексных миРНК мимиков, тогда как разработка оц-мимиков зрелых миРНК все еще представлена ограниченным количеством работ. Синтетические оц-мимики миРНК конструируют согласно фундаментальным канонам функционирования миРНК и, в отличие от оц-siРНК, эти последовательности не являются полностью комплементарными к мРНК-мишеням [212,213] (Рис. 6 Г, Д).

Были разработаны оц-мимики онкосупрессорных миРНК miРНК-34a и let-7a, содержащие различные химические модификации, обеспечивающие устойчивость к клеточным нуклеазам при сохранении способности подавлять РНК-мишень по механизму РНК-интерференции. Оптимизированная структура оц-мимиков миРНК включала 5'-фосфат, 2'-О-МОЕ-модифицированный терминальный нуклеотид, а также чередующиеся 2'-F/2'-ОМе модификации рибозы с фосфоротиоатными/фосфодиэфирными межнуклеотидными связями (Рис. 6 Д (1), В) [213]. Интересно, что в зависимости от мишени эффективность оц- и дц-мимиков значительно различалась. Оц- и дц-мимики miРНК-34a эффективно подавляли экспрессию *SIRT1*, *ARHGAP1*, *E2F5*, *CDK6*, *CDK4*, *MET*, *CCND1*, *E2F3*, *NOTCH2*, *AXL* и *SNAI1* генов-мишеней в клетках HeLa.

Уровень *CCNE2* значительно снижался только под действием оц-мимика миРНК, тогда как подавление *FOSL1*, *SIRT1* и *CD44* было более выраженным при использовании дц-мимиков миРНК. Оц-мимик *let-7a* способствовал подавлению экспрессии генов *FIGN*, *PLAGL2* и *HMGA2* с меньшей эффективностью, чем дц-мимик. Было показано, что активность исследуемых мимиков миРНК зависит от уровня экспрессии AGO2 и эффективности его связывания с ними [213]. Успешный пример терапевтического применения был продемонстрирован для синтетического оц-мимика миРНК-216b, содержащего UNA-модифицированные нуклеотиды (разомкнутые нуклеиновые кислоты от англ. unlocked nucleic acid) в 11 и 22 положении, при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы (Рис. 6Д (2), В) [212]. На клеточной линии Ранс-1 было показано, что при доставке с помощью липосом, функционализированных ТАТ-пептидом, мимик вызывал 90%-ное AGO2-зависимое снижение уровня белка KRAS, способствуя подавлению колониеобразования до 50% [212].

1.3.2.3. Малые тРНК-производные РНК

Белки подсемейства AGO могут участвовать в регуляции генов не только посредством взаимодействия с миРНК, siРНК и туРНК, но и с другими малыми РНК, такими как малые тРНК-производные РНК или tsРНК (от англ. tRNA-derived small RNA). В последние годы tsРНК привлекают все больше внимание исследователей в связи с обнаружением их важной регуляторной роли в поддержании клеточного гомеостаза и возможности их применения для диагностики и создания новых средств терапии [216–219]. tsРНК представляют собой класс малых некодирующих РНК, образующихся путем расщепления различных областей зрелых тРНК или их предшественников рибонуклеазами, такими как ангиогенин, Dicer, РНКаза Z, РНКаза Р и др. (Рис. 7). В зависимости от длины и способа образования, tsРНК подразделяют на две основные группы: производные тРНК, образующиеся в ответ на клеточный стресс (tiРНК от англ. tRNA derived stress-induced RNA), длиной 31-40 н. и тРНК-фрагменты (tRF от англ. tRNA-derived RNA fragment) длиной 14-30 н., которые, в свою очередь, дополнительно подразделяются на несколько типов в зависимости от области молекулы тРНК, из которой они образовались (Рис. 7). tsRNA вовлечены в регуляцию широкого спектра биологических процессов, включая регуляцию транскрипции, трансляции, посттранскрипционной модификации и др. (подробно описано в [220]). tsРНК могут ингибировать экспрессию генов по миРНК-подобному механизму, то есть tsРНК, взаимодействуя с белками AGO, формируют комплекс RISC и комплементарно связываются затравочной областью с 3'-UTR целевой мРНК молекулы, ингибируя ее трансляцию (Рис. 6 Е) [67]. Белки AGO выполняют протекторную функцию, защищая tsРНК от деградации, а также транспортируют связанные tsРНК из внеклеточного пространства во внутриклеточное [221].

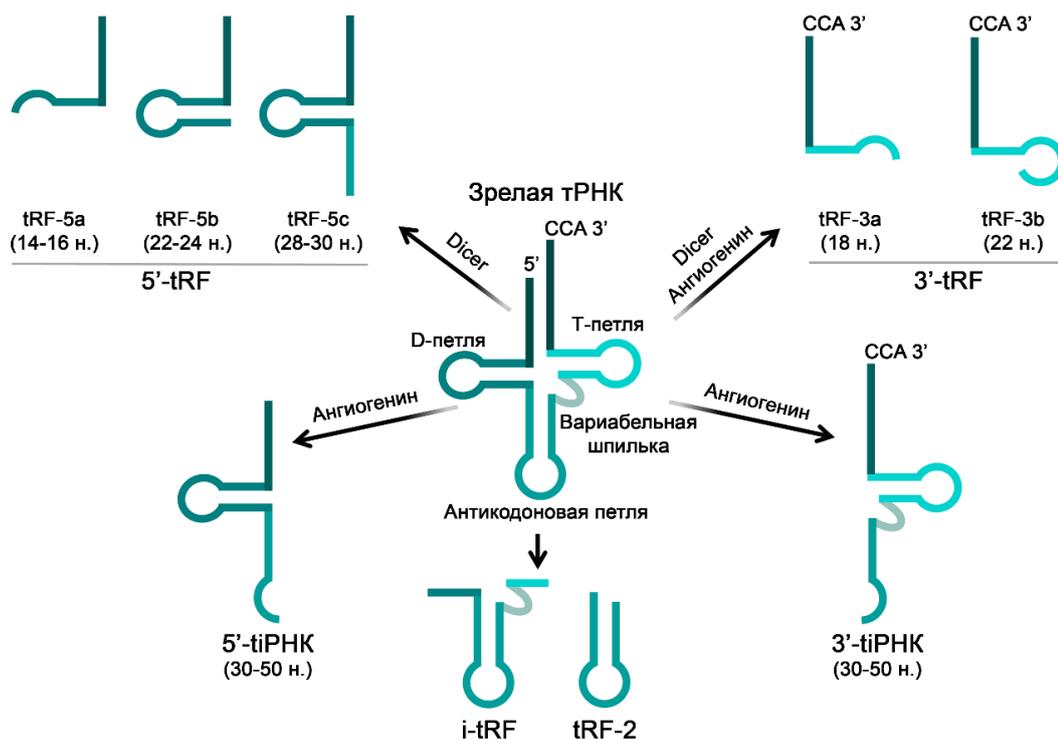


Рис. 7. Биогенез и классификация tsРНК. Схематическое представление образования tsРНК из зрелой тРНК. В результате данного процесса образуется несколько типов tsРНК: тРНК-фрагменты 5'-tRF и 3'-tRF; производные тРНК, образующиеся в ответ на клеточный стресс, такие как 5'-tiРНК и 3'-tiРНК; и внутренние тРНК-фрагменты i-tRF и tRF-2.

Нарушения биогенеза и гомеостаза tsРНК, приводящие к повышенным или пониженным уровням tsРНК, могут быть ассоциированы с развитием патологических состояний, в том числе онкологических [3,222], нейродегенеративных [218] и сердечно-сосудистых заболеваний [219]. На уровень зрелых tsРНК влияют такие факторы, как нарушение активности РНК-полимеразы III, транскрибирующей гены тРНК; посттранскрипционные модификации тРНК; уровень и активность внутриклеточных рибонуклеаз, ответственных за расщепление тРНК; присутствие ингибиторов или модуляторов нуклеаз; трансляционная активность клеток; гормональная регуляция и различные факторы клеточного стресса (подробно описаны в обзоре [223]). Для восстановления патологически сниженного уровня tsРНК в клетках и, как следствие, подавления патологических процессов, исследователи используют синтетические аналоги этих молекул – tsРНК-мимики. Мимики tsРНК используют для изучения функциональных свойств и патофизиологической роли tsРНК, а также, параллельно с этим, для определения их потенциала в качестве терапевтических агентов. Будучи фрагментами природных тРНК, эндогенные tsРНК содержат в своей структуре модификации, поддерживающие их целостность и стабильность [220]. Однако в исследовательских целях преимущественно используют синтетические немодифицированные аналоги tsРНК, стабильность которых обеспечивается используемыми системами доставки.

Дисрегуляция tsRNA ассоциирована с развитием различных онкологических заболеваний. Для определенных типов опухолевых клеток характерно специфическое изменение профиля tsРНК. Например, было обнаружено снижение уровней 5'-tRF- и 3'-tRF-производных тРНК^{Val} в клетках рака молочной железы [224], желудка [225,226] и толстой кишки [227]. Снижение уровня 3'-tRF-производного тРНК^{Glu} было выявлено в опухолевых клетках шейки матки [228], а уровни 3'-tiРНК- и 5'-tiРНК-производных тРНК^{Asn} и тРНК^{Gly}, соответственно, были снижены в опухолевых клетках желудка [229,230]. Было показано, что подавление мРНК-мишени под действием tsРНК осуществляется с вовлечением белков семейства AGO по механизму РНК-интерференции [226–228,230]. Трансфекция опухолевых клеток синтетическими tsРНК-мимиками, обладающими онкосупрессорной активностью, приводила к подавлению их злокачественных свойств. В частности, наблюдалось снижение пролиферации, колониобразования, миграции и инвазии опухолевых клеток, а также индукция апоптоза и арест клеточного цикла [224–230]. Степень выраженности эффектов варьировала в зависимости от типа опухоли, характеристик клеточной линии, молекулярной мишени и используемой концентрации мимика. Совокупный анализ данных свидетельствует о том, что в большинстве исследований tsРНК-мимики обеспечивают умеренный антипролиферативный (15-30%) и проапоптотический эффекты (увеличение с 7–8% в контрольных условиях до 10–16% после обработки), тогда как ингибирующее влияние на колониобразование, миграционные и инвазивные свойства клеток было более выраженным – 50-75% [224–230]. Противоопухолевый эффект также был подтвержден *in vivo* на мышинных моделях с ксенотрансплантатами опухолевых клеток, трансфицированных tsРНК-мимиками [225–227,230]. Так, при обработке опухолевых клеток желудка и толстой кишки tsРНК-мимиками, такими как 3'-tRF- и 5'-tRF-производные тРНК^{Val} и 5'-tiРНК-производная тРНК^{Gly}, было достигнуто 50-70%-ное подавление роста опухоли при использовании мимиков в концентрации 0.05 мкМ, а при увеличении концентрации до 0.1 мкМ наблюдали почти полную регрессию опухоли. Установлено, что противоопухолевая активность tsРНК-мимиков реализуется за счет нацеливания на мРНК, вовлеченных в ключевые сигнальные пути, регулирующие процессы развития опухоли. В частности, продемонстрировано участие tsRNA в модуляции TNBS1/TGF-β1/Smad3 каскада, ассоциированного с эпителиально-мезенхимальным переходом [224], сигнального пути PTEN/PI3K/АКТ, контролирующего процессы пролиферации и дифференцировки клеток [225], канонического MAPK-пути (через мРНК *CACNA1d*), вовлеченного в регуляцию процессов пролиферации некоторых карцином [226], и Wnt/β-катенин сигнального пути (путем прямого нацеливания на FOXK1 транскрипт), вовлеченного в процессы пролиферации, дифференцировки и миграции клеток [227].

В контексте сердечно-сосудистых заболеваний было выявлено, что уровни 3'-tRF-производного tРНК^{Val} и i-tRF-производного tРНК^{Gln} снижены при остром инфаркте миокарда и гипертрофии миокарда, соответственно [231,232]. На модели ангиотензин II-индуцированной гипертрофии трансфекция кардиомиоцитов i-tRF-мимиком приводила к уменьшению степени клеточной гипертрофии и снижению уровня натрийуретических пептидов ANP и BNP на 40% и 70%, соответственно [231]. Введение 3'-tRF мимика в эндотелиальные клетки вызывало снижение уровня мРНК *Tnfrsf10b* и *Bcl2l1*, влияя, вероятно, на сигнальные пути, связанные с липидным обменом и развитием атеросклероза [232].

tsРНК также участвуют в регуляции воспалительных процессов. Например, было показано, что уровни 3'-tRF-производных tРНК^{Cys} и tРНК^{Thr} снижены в хондроцитах при IL-1 β -индуцированном остеоартрите и ацинарных клетках поджелудочной железы с моделью острого панкреатита [233,234]. Введение мимика 3'-tRF-производного tРНК^{Cys} в хондроциты приводило к снижению экспрессии мРНК JAK3 [234]. Трансфекция клеток 3'-tRF-мимиком производного tРНК^{Thr} способствовала восстановлению выживаемости клеток, нормализации воспалительного ответа и индукции экспрессии белков, ассоциированных с пироптозом, за счет деградации ZBP1 мРНК и инактивации провоспалительного сигнального пути ZBP1/NLRP3 [233].

1.4. PIWI белки как ключевые медиаторы РНК-ингибирующего действия рiРНК

1.4.1. Структура, механизм действия и основные функции белков PIWI

PIWI белки принадлежат к семейству Argonaute и являются ключевыми медиаторами работы PIWI-взаимодействующих РНК или рiРНК. рiРНК представляют собой класс малых некодирующих молекул РНК длиной около 24-32 н., которые взаимодействуют с белками PIWI, формируя рiРНК/PIWI комплекс, и играют ключевую роль в процессах регуляции жизнедеятельности стволовых клеток зародышевой линии, защиты генома от мобильных элементов, эпигенетического контроля регуляции и управления активностью белков. В процессе биогенеза рiРНК образуются из длинных одноцепочечных РНК предшественников, транскрибируемых со специфических геномных локусов. Биогенез и процессинг предшественников рiРНК представляет собой сложный многостадийный процесс, протекающий по двум основным путям (путь первичного биогенеза и пинг-понг амплификация) с участием различных ферментов и приводит к формированию зрелых молекул рiРНК, содержащих остаток урацила на 5'-конце и 2'-ОМе-модификацию на 3'-конце (подробнее описан в [235,236]) (Рис. 8 А). В отличие от белков AGO, которые экспрессируются повсеместно, белки PIWI экспрессируются преимущественно в стволовых клетках зародышевой линии [65,66], тогда как в соматических клетках их уровень значительно снижен. Тем не менее, объем экспериментальных

данных, свидетельствующих о функциональной значимости рiРНК в соматических клетках, продолжает неуклонно расширяться [4,62–64].

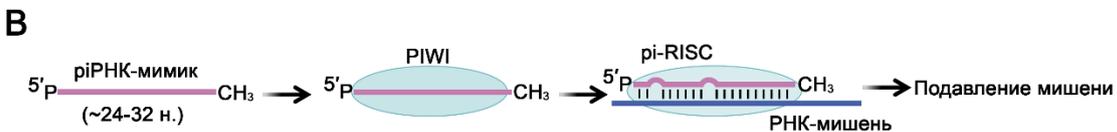
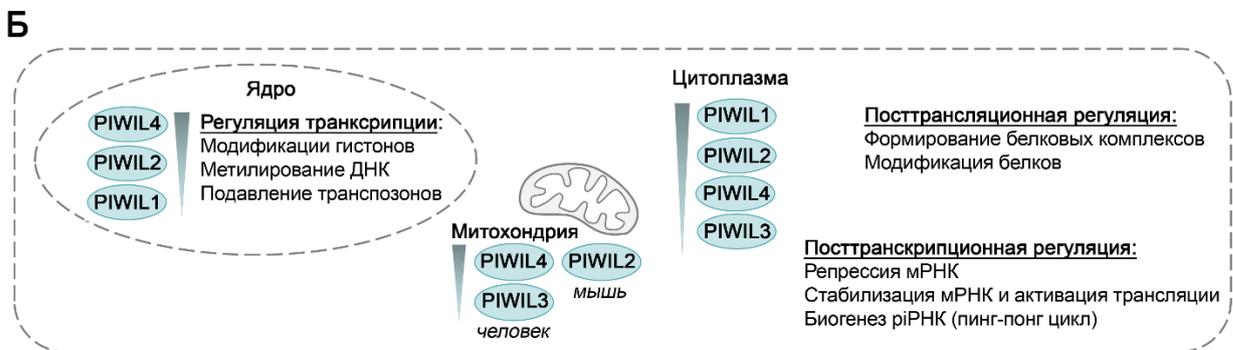
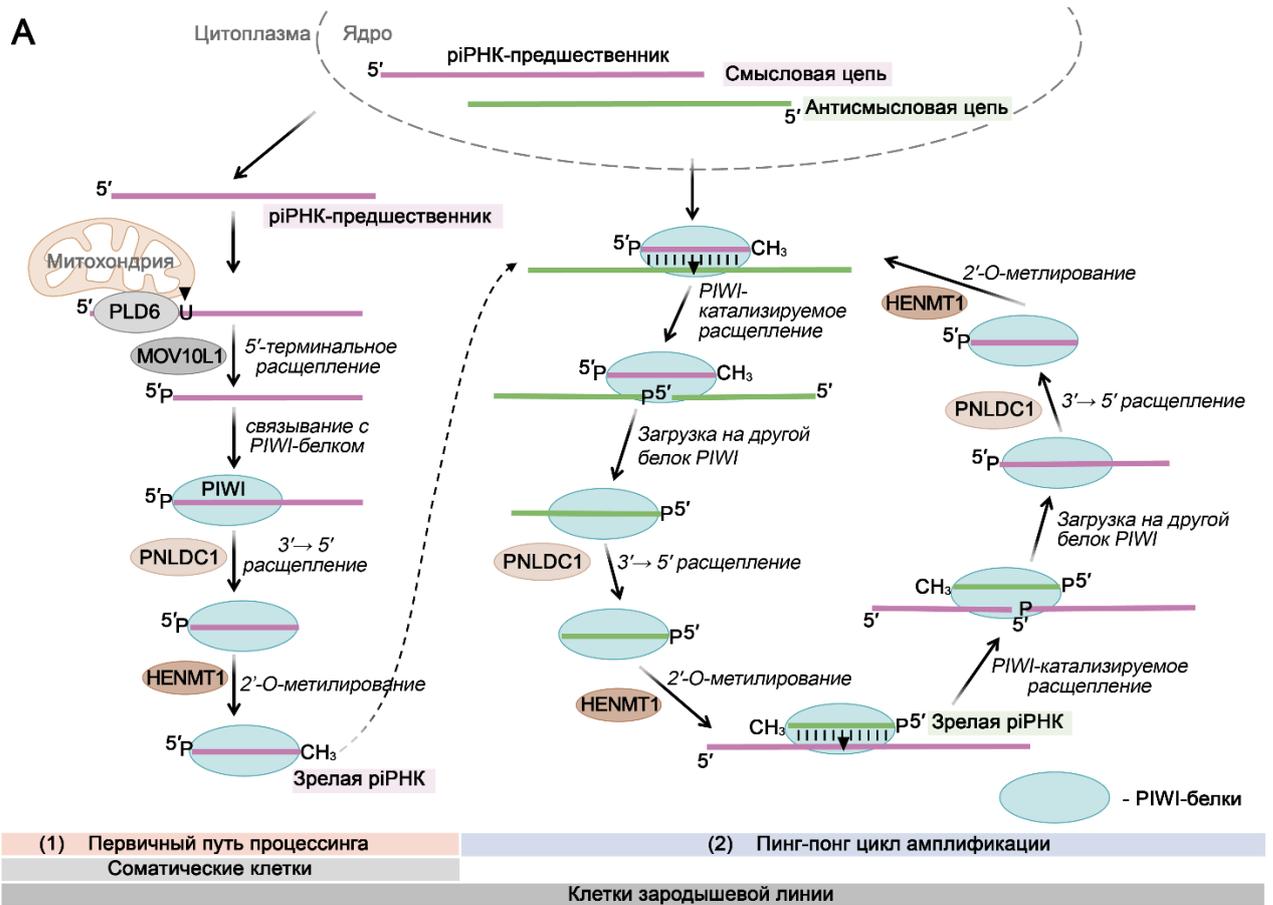


Рис. 8. Биогенез рiРНК и компартмент-специфические функции белков семейства PIWI млекопитающих. **А** – биогенез рiРНК. Образование рiРНК происходит по двум основным путям: (1) первичный процессинг начинается с транскрипции кластеров рiРНК, за которой следует их эндонуклеолитическое расщепление белком PLD6 при участии геликазы MOV10L1, что приводит к образованию 5'-монофосфорилированных фрагментов, взаимодействующих с белками семейства PIWI. Далее экзонуклеаза PNLDC1 вырезает эти фрагменты с 3'-конца, а метилтрансфераза HENMT1 осуществляет 2'-О-метилирование, в результате чего формируются зрелые первичные рiРНК, участвующие в транскрипционном и посттранскрипционном сайленсинге генов; (2) вторичный биогенез реализуется по механизму пинг-понг амплификации, который преимущественно активен в клетках зародышевой линии и отсутствует или ослаблен в

соматических клетках. В этом процессе PIWI-белки (PIWIL2 и PIWIL4), направляемые piРНК, расщепляют целевые транскрипты, образуя новые 5'-монофосфорилированные предшественники piРНК. Затем предшественники piРНК подвергаются дальнейшему процессингу и взаимодействуют с другими PIWI-белками, формируя само-амплифицируемую систему генерации piРНК, обеспечивающую образование зрелых вторичных piРНК, участвующих в функциональной регуляции генов [235,236]. **Б** – субклеточная функциональная специализация белков PIWI. Компартментализация белков PIWI отражает их преимущественное распределение в клетке в зависимости от выполняемых функций. Представленное пространственное распределение белков является обобщенным, поскольку локализация PIWI динамична и зависит от контекста [68,69,236,237]. **В** – схема подавления РНК-мишени при участии piРНК и белков PIWI. piRISC – piРНК-индуцированный комплекс выключения генов. P – 5'-монофосфат. CH₃ – 2'-О-метильная группа. U – урацил на 5'-конце, являющийся предпочтительным сайтом расщепления для PLD6.

Структура и функции белков подсемейства PIWI высоко консервативны у различных организмов. В тканях человека идентифицировано 4 гомолога: PIWIL1 (HIWI), PIWIL2 (HILI), PIWIL3 (HIWI3) и PIWIL4 (HIWI2) [238]. Подобно белкам AGO, PIWI белки состоят из варибельного N-концевого домена, центральных PAZ и MID доменов, а также C-концевого PIWI домена, обладающего эндонуклеазной активностью (Рис. 4). PAZ домен распознает 2'-ОМемодифицированный 3'-конец piРНК, а MID домен связывается с фосфорилированным 5'-концом молекулы [239].

Функциональная значимость piРНК проявляется на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях (Рис. 8 Б) [68,69,236,240]. На транскрипционном уровне piРНК/PIWI комплекс осуществляет подавление генов путем метилирования ДНК и модифицирования гистонов. Посттранскрипционное подавление активности РНК осуществляется путем взаимодействия piRNA/PIWI комплекса с днкРНК или мРНК мишенями с формированием piРНК-индуцированного комплекса подавления генов (piRISC) для разрушения РНК по миРНК-подобному механизму (Рис. 8 В). Для осуществления расщепления мишени белки PIWI, в отличие от AGO, требуют более протяженного, но менее строгого комплементарного связывания piРНК с РНК-мишенью. В экспериментах с белками PIWI мышей было показано, что PIWI способны распознавать и расщеплять мишени даже при отсутствии полной комплементарности в затравочной области (со 2 по 8 н. piРНК), при этом допустимы миссмаччи в сайте расщепления мишени (10 и 11 н. РНК-мишени). Однако, для эффективного расщепления РНК-мишени PIWI белкам требуется минимум 15 спаренных нуклеотидов в дуплексе piРНК с мишенью [241]. Благодаря толерантности к миссмаччам, piРНК-зависимый путь посттранскрипционного подавления генов приобретает высокую адаптивность, что обеспечивает эффективное распознавание и подавление быстро эволюционирующих транспозонов. На посттрансляционном уровне piРНК/PIWI комплекс контролирует функциональную активность транскрипционных факторов путем фосфорилирования и убиквитинирования. Белки PIWIL1, PIWIL2 и PIWIL4 экспрессируются на различных стадиях

развития как в клетках зародышевой линии, так и в соматических клетках, тогда PIWIL3 экспрессируется преимущественно в созревающих ооцитах человека в период оогенеза [242]. Белки PIWIL1 и PIWIL2 преимущественно принимают участие в деградации транскриптов в цитоплазме, т.е. участвуют в процессах на посттранскрипционном уровне, PIWIL3 функционирует только в ооцитах, регулируя цитоплазматические транскрипты, тогда как PIWIL4 участвует в транскрипционном подавлении генов в ядре [69].

Растущий интерес к рiРНК обусловлен их непосредственным участием в различных биологических процессах, включая регуляцию клеточной пролиферации и метаболизма, контроль клеточного цикла, процессов инвазии, метастазирования и апоптоза, а также модуляцию иммунного ответа. Следовательно, нарушение экспрессии рiРНК ассоциировано с развитием различных патологических состояний, что определяет их потенциал в качестве диагностических маркеров и терапевтических мишеней.

1.4.2. PIWI-опосредованное ингибирование РНК под действием синтетических рiРНК

Аналогично ранее рассмотренным малым РНК, таким как миРНК и tsРНК, рiРНК участвуют в посттранскрипционном подавлении экспрессии генов, а нарушение их регуляции, приводящее к снижению или повышению уровня рiРНК, ассоциировано с развитием различных патологических состояний, включая онкологические, сердечно-сосудистые заболевания, нарушения функционирования нервной и репродуктивной систем, а также вирусные инфекции [64]. Использование синтетических рiРНК-мимиков для восстановления функций рiРНК со сниженным уровнем экспрессии в партнерстве с активностью PIWI-белков является перспективным терапевтическим подходом (Рис. 8 В). Например, недавнее исследование показало, что в опухолевых клетках поджелудочной железы снижен уровень рiРНК-017061, и трансфекция этих клеток 2'-ОМе-модифицированным мимиком рiРНК-017061 приводила к значительному противоопухолевому действию как *in vitro*, способствуя подавлению роста клеток на 30% и колониеобразования на 50%, так и *in vivo* на ксенографтной модели мышей, вызывая торможение роста опухоли на 90% и способствуя индукции апоптоза. рiРНК-017061 взаимодействует с белком PIWIL1, приводя к деградации мРНК-мишени *EFNA5* [243]. Аналогично, в клетках почки со светлоклеточной карциномой был обнаружен сниженный уровень рiРНК-57125. Трансфекция опухолевых клеток синтетическим мимиком приводила к подавлению их миграционного и инвазивного потенциала на 40-60%, не оказывая влияния на пролиферацию. Механизм действия основан на способности рiРНК-57125 напрямую связываться с 3'-UTR мРНК *CCL3* и подавлять её экспрессию через PIWIL4-зависимый RISC путь. Результатом *CCL3* ингибирования является блокировка сигнального каскада АКТ/ERK, играющего ключевую роль в процессах метастазирования [244].

Применение рiРНК-мимиков также исследуется в контексте противовирусной терапии. Так, трансфекция клеточной линии фибробластов легких человека мимиком рiРНК-28,382 с последующим инфицированием клеток вирусом простого герпеса первого типа приводила к снижению титра вируса на 15% [245]. С помощью биоинформатического анализа авторы выявили, что потенциальными мишенями рiРНК-28.382 могут быть гены вируса *RL2*, *RS1* и *UL54*.

Потенциал РiWI белков также исследуют при использовании клеток, трансфицированных векторной конструкцией, экспрессирующей терапевтические рiРНК. Экспрессия рiРНК-19166, уровень которой снижен в клетках карциномы простаты, обеспечивала подавление миграционной активности опухолевых клеток *in vitro* на 40% и ингибирование метастазирования на 75% на мышинной модели за счет подавления мРНК *CTTN*, ключевого участника *CTTN/MMPs* сигнального пути, ответственного за метастазирование [246]. Аналогично, экспрессия рiРНК-18 в клетках колоректальной карциномы приводила к снижению пролиферации и миграции клеток *in vitro* на 20% и 40%, соответственно, а также к снижению опухолевого роста у мышей на 40% [247].

1.5. Сиквенс-специфические искусственные рибонуклеазы (иРНКазы) с собственной каталитической активностью

Одним из перспективных направлений в развитии РНК-направленной терапии является разработка и применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз (иРНКаз). Эти РНК-расщепляющие соединения представляют собой гибридные молекулы, которые сочетают в единой структуре адресующий олигонуклеотид, обеспечивающий избирательное связывание с РНК-мишенью, и ковалентно присоединённый каталитический домен, способный расщеплять фосфодиэфирные связи в РНК. Помимо собственной каталитической активности, наличие адресующего олигонуклеотида может повышать эффективность этих ингибиторов в результате рекрутирования эндогенной РНКазы H1. В настоящее время разработано несколько типов иРНКаз, среди которых можно выделить металл-зависимые иРНКазы, в которых РНК-адресующий олигонуклеотид конъюгирован с комплексами металлов, включая ионы лантаноидов (Dy^{3+} , Eu^{3+} и др.) и двухвалентные ионы Cu^{2+} и Zn^{2+} [248–257], и металл-независимые иРНКазы, в которых в качестве каталитических групп используют остатки имидазола, короткие пептиды или лиганды, имитирующие каталитические центры природных нуклеаз (в частности, стафилококковой нуклеазы, РНКазы А и РНКазы H1) [258–262]. Металл-зависимые иРНКазы демонстрируют высокую эффективность расщепления РНК, но не стабильны в условиях *in vivo* в присутствии конкурирующих белковых лигандов и других биодоступных металлов. Металл-независимые иРНКазы, напротив, обладают более низкой токсичностью, что обеспечивает возможность их использования во внутриклеточных условиях.

Первоначально активность сиквенс-специфических иРНКаз исследовали преимущественно на модельных РНК-субстратах (тРНК, синтетических РНК) [41,250,270,271,258,263–269], однако позднее эти конструкции стали использовать для расщепления биологически значимых РНК. Например, 2'-О-МОЕ-модифицированные олигонуклеотиды, координированные с комплексом европия, катализировали специфическое расщепление транскриптов проонкогенного гена протеинкиназы c-raf-1 человека длиной 571 и 2977 н. [272]. Применение иРНКаз, состоящих из акридин-модифицированного ДНК-домена и ионов лантанидов (III) в качестве каталитического домена, обеспечивало расщепление фрагмента гена аполипопротеина E человека длиной 40 н., что позволило идентифицировать однонуклеотидный полиморфизм в целевом участке [273]. Альтернативным подходом является применение металл-независимых иРНКаз, состоящих из ДНК или LNA/ДНК-миксмерного распознающего олигонуклеотида и каталитического домена на основе трис(2-аминобензимидазола), которые показали высокую эффективность расщепления транскриптов длиной 150-400 н., соответствующих участкам 3'-UTR мРНК серин/треониновой киназы PIM1 [42,274]. Интересным направлением использования иРНКаз такой структуры является их применение для анализа структуры мРНК-вакцин [43]. В этом случае синтетические иРНКазы специфически расщепляют синтетическую РНК, моделирующую структуру типичной мРНК-вакцины, в определенных участках (на 3'-конце для отщепления поли-А-хвоста и в 5'-области для анализа кЭП-структуры), что позволяет получить короткие фрагменты, пригодные для высокоточного анализа методами HPLC и L-МС [43]. Для недавно разработанных Zn²⁺-зависимых иРНКаз на основе ПНК с конъюгированным диметил-дипиридофеназином была продемонстрирована высокая эффективность расщепления клинически значимых РНК, таких как мРНК *Plasmodium falciparum EXP1*, кодирующая мембранный белок, участвующий в транспорте питательных веществ паразита, и фрагмент геномной РНК SARS-CoV-2, кодирующий вирусную папаиноподобную протеазу PLpro [254,255].

Наиболее успешно сиквенс-специфические иРНКазы применяют для селективного подавления активности миРНК. Особый интерес представляют конструкции, в которых адресующим доменом является пептидо-нуклеиновая кислота (ПНК) – аналог нуклеиновых кислот с синтетическим пептидным остовом, состоящим из остатков N-(2-аминоэтил)-глицина, к которому азотистые основания присоединены с помощью метилен карбонильных связей. Благодаря высокой аффинности к РНК-мишени, высокой нуклеазоустойчивости, химической и биологической стабильности ПНК широко применяются в РНК-связывающих доменах иРНКаз [44]. Нейтральный заряд остова ПНК имеет некоторые недостатки, такие как ограниченная растворимость в воде, формирование гидрофобных агрегатов, низкий уровень доставки в клетки.

Путем конъюгирования олигомеров ПНК с катионными аминокислотами, СРР или гидрофильными полимерами эти проблемы могут быть частично преодолены.

Gaglione с коллегами разработали два типа миРНКаз с адресующим ПНК-доменом: (I) Cu^{2+} -зависимую РНКазу с HGG-пептидом в качестве расщепляющего домена и (II) металл-независимую РНКазу, в которой каталитическая группа представлена диэтилентриамином (ДЭТА) [44]. Связующий домен был адресован к миРНК-1323 человека, гиперэкспрессирующейся при нейробластоме, и представлял собой 14-звенную последовательность ПНК, фланкированную с С- и N-конца полиэтиленгликолем (ПЭГ) для улучшения растворимости. Было показано, что конъюгаты I и II типа способны специфически и с высокой эффективностью расщеплять РНК при эквимолярном соотношении в физиологических условиях. Эффективность расщепления мишени достигала максимума через 1 ч реакции и составляла 47.5% для конъюгата I типа и 90% для конъюгата II типа [44].

Danneberg с коллегами исследовали активность двух металл-независимых сиквенс-специфических иРНКаз на основе ДНК или ПНК с трис(2-аминобензимидазолом), направленных к миРНК-20а, принадлежащей к онкогенному кластеру миРНК-17~92. Было установлено, что оба типа обеспечивают 50%-ное расщепление мишени за 12 – 17 ч [41,264].

Среди разработанных миРНКаз наибольшего успеха достигли пептидные миРНКазы, разработанные в ИХБФМ СО РАН, а также совместно с Университетом Манчестера. Эти конструкции, состоящие из шпилечного олигонуклеотида и каталитического пептида acetyl-(LR)₄G-NH₂ или (LRLRG)₂, показали выраженную анти-миРНК активность на культурах опухолевых клеток и на мышинных моделях. Шпилечная миРНКазы с пептидом (LR)₄G-NH₂ вызывала дозозависимое ингибирование миРНК-17 в клетках меланомы В16 (на 40% и 80% при концентрации 100 и 500 нМ, соответственно), что приводило к двукратному повышению уровня мишени E2F1 и подавлению пролиферации клеток в 5 раз [46]. Шпилечная миРНКазы с пептидом acetyl-(LRLRG)₂ снижала уровень миРНК-21 на 50 % в клетках лимфосаркомы RLS₄₀, повышая экспрессию прямых мишеней PTEN и PDCD4 в 1.7 и 2.4 раза, соответственно, и подавляя пролиферативную активность клеток [45,47]. Введение мышам клеток лимфосаркомы RLS₄₀, трансфицированных этой миРНКазой, приводило к подавлению роста опухоли на 95%, что значительно превышало действие неконоъюгированных олигонуклеотидов [47].

Заключение

Эндогенные рибонуклеазы, включая РНКазу H1, РНКазу Р и белки семейства AGO, играют фундаментальную роль в обеспечении антисенс-индуцированной инактивации целевых молекул РНК. Эффективность этих технологий зависит от комплексного понимания механизмов

действия используемых ферментов, что позволяет разрабатывать высокоэффективные стратегии модуляции активности РНК для терапевтических применений.

Очевидно, что на эффективность антисмыслового ингибирования оказывают влияние различные молекулярные и структурные параметры, такие как выбор последовательностей РНК-мишени, её структурная доступность и внутриклеточная локализация, компарментализация ферментов (РНКаза H1, РНКаза Р и белки семейства AGO), паттерн химических модификаций терапевтических нуклеиновых кислот, а также молекулярные механизмы систем доставки, обеспечивающие специфический транспорт ингибиторов.

В отношении выбора молекулярной мишени АСО представляют собой универсальный инструмент, разработанный для направленного воздействия практически на любую внутриклеточную последовательность РНК с учётом их структурной доступности, включая мРНК, пре-миРНК, миРНК, днкРНК, рiРНК, кольцевые РНК и др. Повсеместная локализация РНКазы H1, в ядре, цитоплазме и митохондриях, в сочетании с широким спектром потенциальных РНК-мишеней, делает данную технологию высокоадаптивной и мощной молекулярной стратегией. Подход, основанный на использовании АСО, представляющих собой EGS, обеспечивает локализацию терапевтических нуклеиновых кислот совместно с РНКазой Р преимущественно в ядерном компартменте, что позволяет эффективно нацеливать ингибитор на вирусные и бактериальные транскрипты. Благодаря гомологии с эндогенными молекулами, одноцепочечные мимики малых РНК (миРНК, tsРНК и рiРНК) совместно с белками семейства AGO обеспечивают посттранскрипционное подавление генов, что преимущественно осуществляется в цитоплазме. Среди белков PIWI, PIWIL1 и PIWIL4 в большей степени вовлечены в реализацию механизмов РНК-интерференции с использованием синтетических рiРНК. Примечательно, что способность белков семейства AGO к динамической транслокации между ядерным и цитоплазматическим компартментами обеспечивает стратегический механизм расширения репертуара потенциальных РНК-мишеней [275]. В то время как миРНК преимущественно подавляют экспрессию генов за счёт ингибирования трансляции и деградации РНК, другие малые РНК, такие как рiРНК и tsРНК, могут выполнять более широкий спектр регуляторных функций, включая ремоделирование хроматина и транскрипционное подавление, действуя как в цитоплазме, так и в ядре. Несмотря на то что белки подсемейства AGO, в частности AGO2, достаточно подробно охарактеризованы на структурном и функциональном уровнях, изученность PIWI-белков человека все еще остается ограниченной. На сегодняшний день получены структурные данные лишь для отдельных доменов PIWI-белков, преимущественно для уточнения их специфических молекулярных функций, тогда как пространственная организация полноразмерных белков до сих пор не установлена. Дальнейшая характеристика белков PIWI, в особенности их компартмент-специфической активности и

механистической роли, представляется перспективным направлением, способным раскрыть их дополнительные функциональные возможности и терапевтический потенциал.

Для достижения оптимальной терапевтической эффективности требуется разработка систем доставки, обеспечивающих локализацию терапевтических нуклеиновых кислот в непосредственной близости от РНК-мишени и связанных с ней ферментных систем. Несмотря на десятилетия интенсивных исследований и достигнутый значительный прогресс, задача таргетной доставки лекарственных средств остаётся нерешённой и по-прежнему представляет собой одно из ключевых направлений развития молекулярной терапии.

Общая структурная организация и химический состав терапевтических олигонуклеотидов являются определяющими факторами их биологической активности. Терапевтический потенциал антисмысловых олигонуклеотидов и одноцепочечных РНК был всесторонне изучен. Значительная часть исследований направлена на структурную оптимизацию, разработку и введение различных химических модификаций и их комбинаций с целью повышения молекулярной биосовместимости и функциональных свойств. Для обеспечения способности олигонуклеотидов рекрутировать РНКазу H1 химические модификации должны сохранять геометрическую целостность формируемого с целевой РНК гетеродуплекса. Несмотря на то что исследователями создан обширный арсенал химических модификаций, поиск оптимальных структурных вариантов до сих пор продолжается с целью повышения устойчивости к нуклеазам, снижения иммуногенности и токсичности при сохранении высокой терапевтической эффективности.

Изучение терапевтического потенциала мимиков tsРНК и рiРНК представляет собой относительно новое активно развивающееся направление исследований. В связи с ограниченным пониманием влияния химических модификаций на активность этих молекул исследователи преимущественно используют терапевтические нуклеиновые кислоты в их нативной форме, без дополнительных химических изменений. Однако можно ожидать, что в ближайшем будущем будут разработаны синтетические аналоги tsРНК и рiРНК с улучшенными химическими и биологическими свойствами.

Следует отметить, что исследования терапевтического потенциала некодирующих РНК, особенно tsРНК и рiРНК, в ассоциации с белками подсемейств AGO и PIWI, преимущественно проводятся в контексте онкологических заболеваний. Такая направленность, вероятно, обусловлена широкой доступностью и экспериментальной легкостью опухолевых моделей, которые представляют удобные системы для изучения молекулярных функций и оценки терапевтического потенциала соединений, в особенности на ранних этапах исследований. Тем не менее, ожидается, что спектр патологий, потенциально поддающихся терапии с использованием этих новых подходов, будет постепенно расширяться. По мере углубления понимания

специфических функций tsРНК и рiРНК в тканях, терапевтический потенциал этих молекул, вероятно, значительно возрастёт и выйдет за рамки онкологических применений.

Перспективной альтернативой эндогенным ферментативным системам является разработка гибридного подхода, основанного на создании сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз (иРНКаз). Эти соединения сочетают в своей структуре олигонуклеотидный адресующий домен, обеспечивающий специфическое узнавание РНК-мишени, и каталитический домен природного происхождения, что позволяет осуществлять автономное связывание и деградацию РНК [41,42,45,254,276]. Дополнительное вовлечение РНКазы Н1 существенно усиливает специфическое разрушение РНК [47], что показывает, как принципы функционирования природных рибонуклеаз могут быть использованы для разработки более эффективных терапевтических стратегий.

Таким образом, сочетание каталитической активности рибонуклеаз с высокоэффективным нацеливанием на терапевтически значимые РНК-мишени с помощью нуклеиновых кислот представляет собой уникальный и высокоспецифичный терапевтический подход, который дополнительно реализует ферментативный потенциал клеточных систем. Данный подход отличается высокой биологической комплементарностью, поскольку использует естественные метаболические механизмы клетки, что способствует минимизации побочных эффектов, повышению селективности действия и созданию автономной, физиологически интегрированной терапевтической системы.

2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В работе использовали N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), трис-(оксиметил)-аминометан (Трис), персульфат аммония (PSA) (ICN, США); этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), мочевины, борную кислоту ("MP Biomedicals", США); водонасыщенный фенол (Ambion, США); диметилсульфоксид (ДМСО) (ЭКОС-1, Россия); акриламид, Stains-All, фиколл, культуральную среду Дульбекко в кодификации Игла (DMEM), культуральную среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), бычью эмбриональную сыворотку (БЭС), 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ), перхлорат лития (Sigma-Aldrich, США); среду Opti-MEM, обезжиренное сухое молоко, TRIzol, Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, США); этиловый и изопропиловый спирт, ацетат натрия, хлороформ, ацетон, бромфеноловый синий (Реахим, Россия); ксиленианол (Serva, Германия); раствор антибиотиков и антимиотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) (Биохимик, Россия); парафин HISTOMIX, формалин (BioVitrum, Россия); RIPA-буфер, маркер молекулярного веса белка PageRuler Plus 10-250 кДа (ThermoScientific, США); моноклональные 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, Великобритания), каспазе-3 (ab2302, Abcam, Великобритания) и вторичные антитела козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные пероксидазой хрена (ab6721, Abcam, Великобритания и Spring Bioscience detection system, США), хемоллюминесцентный раствор субстрата пероксидазы хрена (Abcam, Великобритания); ферменты: полинуклеотидкиназа Т4, рибонуклеаза H1, рибонуклеаза T1 (ThermoScientific, США); ОТ набор с обратной транскриптазой M-MuLV-RH и HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс, Россия); буфер Laemmli x 4 (Bio-Rad, США); лизирующая матрица Lysing matrix D (MP Biomedicals, Индия); WST-1 (Roche, Швейцария); флуоресцентные красители 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, США) и CytoPainter Phalloidin-iFluor 488 (ab176753, Abcam, Великобритания); защитная среда для окрашенных образцов ProLong Gold Antifade Mountant (Life Technologies, США).

2.1.2. Оборудование

В работе были использованы: центрифуги MiniSpin Plus Eppendorf, Eppendorf 5415R и 5410R (Eppendorf, Германия); магнитная мешалка MR 3001, вортекс Reaxtop (Heidolph, Германия); микротермостат модели 208 (БИС-Н, Россия); система очистки воды Milli-Q

(Millipore, США); камера для полиакриламидного электрофореза (Helicon, Россия и Kodak, США); вакуумная сушка для гелей (Cleaver Scientific, Великобритания); система геледокументации PharosFX Plus, источник питания Power-pac 3000, усилитель в режиме реального времени Bio-Rad CFX96, прибор для электропереноса Criterion Blotter, счётчик клеток и анализатор их жизнеспособности TC20 (Bio-Rad, США); усилитель Mastercycler Pro (Eppendorf, Германия); роботизированная система автоматического дозирования Robotics (Corbett, США) и epMotion 5073 (Eppendorf, Германия); спектрофотометр NanoDrop OneC, автоматический многоканальный фотометр Multiscan FC, система визуализации iBright 1500 (ThermoScientific, США); pH-метр (Orion 410A, США); гомогенизатор FastPrep-24TM 5G с адаптером QuickPrep 24 (MP Biomedicals, Индия); система *in vivo* визуализации IVIS Lumina X5 (Revvity, США); CO₂ инкубаторы InCuSafe (Sanyo, Япония); клеточный анализатор в режиме реального времени xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, Inc., США); микроскопы Zeiss Primo Vert, AxioStar Plus с камерой AxioCam MRc5 и LSM 710 (Zeiss, Германия); криостат Microm HM 505N, микротом Microm HM 355S (ThermoScientific, 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, ZEN Black Edition v. 8.1, ImageJ, iBright Analysis Software, GraphPad Prism 8.4.3.

2.1.3. Олигонуклеотиды и миРНКазы

МиРНК-17, миРНК-18a, миРНК-21, миРНК-21_1 и миРНК-155 (Таблица 2), содержащие ОН-группу на 5'-конце, были синтезированы к.х.н. М. И. Мещаниновой 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 2. Последовательности миРНК, использованные в работе.

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

Исследованные в работе миРНКазы были синтезированы к.б.н. О. А. Патутиной, д-ром Б. Амирло и д-ром Т. Хейман в лаборатории к.х.н. Е. В. Биченковой в Университете Манчестера (Манчестер, Великобритания). Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН с помощью стандартного

фосфитамидного метода и выделены с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Последовательности миРНКаз и олигонуклеотидов приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Последовательности миРНКаз и олигонуклеотидов, используемых в работе.

Название	Последовательность 5'→3'
Двойные олигонуклеотиды (D-ON)	
21-D-ON	ТСААСАТС–(ТЭГ) ₂ –GATAAGСТА
18a-D-ON	ТАТСТГС–(ТЭГ) ₂ –АТГСАСТТА
17-D-ON	СТАСТГС–(ТЭГ) ₂ –ААГСАСТТТГ
155-D-ON	АСССТАТ–(ТЭГ) ₂ –ТТАГСАТТАА
Одинарные миРНКазы (SC)	
21-SC	ПЕП–линкер 2–GATAAGСТА
18a-SC	ПЕП–линкер 2–АТГСАСТТА
17-SC	ПЕП–линкер 2–ААГСАСТТТГ
155-SC	ПЕП–линкер 2–ТТАГСАТТАА
Двойные миРНКазы (DC)	
21-DC	ТСААСАТС–линкер 1–ПЕП–линкер 2–GATAAGСТА
18a-DC	ТАТСТГС–линкер 1–ПЕП–линкер 2–АТГСАСТТА
17-DC	СТАСТГС–линкер 1–ПЕП–линкер 2–ААГСАСТТТГ
155-DC	АСССТАТ–линкер 1–ПЕП–линкер 2–ТТАГСАТТАА
Петлеобразующие олигонуклеотиды (B-ON)	
17-B-ON	СТАСТГСАС–dR–ААГСАСТТТГ
21-B-ON	ТСААСАТСАГТ–dR–АТААГСТА
Петлеобразующие миРНКазы (BC)	
17-BC-α	СТАСТГСАС – dR ^α (ПЕП) – ААГСАСТТТГ
17-BC-β	СТАСТГСАС – dR ^β (ПЕП) – ААГСАСТТТГ
17-BC-αα	СТАСТГСАС – [dR ^α (ПЕП)] ₂ – ААГСАСТТТГ
17-BC-ββ	СТАСТГСАС – [dR ^β (ПЕП)] ₂ – ААГСАСТТТГ
21-BC-α1	ТСААСАТСАГТ – dR ^α (ПЕП) – АТААГСТА
21-BC-α2	ТСААСАТСАГ – dR ^α (ПЕП) – GATAAGСТА
21-BC-β1	ТСААСАТСАГТ – dR ^β (ПЕП) – АТААГСТА
21-BC-β2	ТСААСАТСАГ – dR ^β (ПЕП) – GATAAGСТА
Крабоподобные олигонуклеотиды (C-ON)	
21-C-ON	АТСАГТСТГАТАА
17-C-ON	ТГСАСТГТААГСА
Крабоподобные миРНКазы (CC)	
21-CC-αα	ПЕП–dR ^α – АТСАГТСТГАТАА– dR ^α –ПЕП
21-CC-ββ	ПЕП–dR ^β – АТСАГТСТГАТАА– dR ^β –ПЕП
21-CC-pp	ПЕП–Линкер 3 –p–АТСАГТСТГАТАА– p Линкер 1–ПЕП
21-CC-5'p	ПЕП–Линкер 3 –p–АТСАГТСТГАТАА
21-CC-3'p	АТСАГТСТГАТАА–p –Линкер 1–ПЕП
21-CC-5'α/21-CC-3'α [#]	ПЕП–dR ^α – АТСАГТСТГАТАА– dR ^α и dR ^α – АТСАГТСТГАТАА– dR ^α –ПЕП
17-CC-αα	ПЕП–dR ^α – ТГСАСТГТААГСА– dR ^α –ПЕП

17-CC-5'α/17-CC-3'α [#]	ПЕП-dR ^α – TGCAGTGTAAAGCA– dR ^α и dR ^α – TGCAGTGTAAAGCA– dR ^α –ПЕП
Краболоподобные неспецифические конъюгаты и олигонуклеотиды	
Scr-CC-αα	ПЕП-dR ^α – CAAGTCTCGTATG– dR ^α –ПЕП
Scr-C-ON-αα	dR ^α – CAAGTCTCGTATG– dR ^α
Вилкоподобные олигонуклеотиды (F-ON)	
21-F-ON	AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC
Cy5.5-21-F-ON	Cy5.5– AGTCTGATAAGCTAGTCAGCGAAAGCTGAC
Вилкоподобные миРНКазы (FC)	
21-FC-αp	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

ПЕП – каталитический пептид [GRLRL]₂. Линкер 1 – 3'-6-амино-2-(гидроксиметил)гексильный линкер (–CH₂–CH(CH₂OH)–(CH₂)₄–NH–), Линкер 2 – тиогексильный линкер (–(CH₂)₆–S–), ТЭГ – триэтиленгликолевый линкер (–O–(CH₂CH₂O)₃–), Линкер 3 – аминогексильный линкер (–NH–(CH₂)₆–). 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. p – фосфатная группа адресующего олигонуклеотида. [#] – побочные продукты синтеза, представляющие собой смесь двух олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с одним пептидом. A – 2-аминодезоксаденозин. Последовательность, выделенная курсивом – шпилечная структура. Cy5.5 – флуоресцентный цианиновый краситель.

Последовательности специфических праймеров для реакции обратной транскрипции и количественной ПЦР указаны в Таблице 4 и Таблице 5, соответственно.

Таблица 4. Последовательности специфических к миРНК шпилечных праймеров, использованных для реакции обратной транскрипции.

Обозначение праймеров	Последовательность 5'→3'
<i>RT-mir-17</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACC TACCTGCAC
<i>RT-mir-18a</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACT ATCTGCACT
<i>RT-mir-21</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACT CAACATCAG

<i>RT-mir-155</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC ACCCCTATCA
<i>RT-let7g</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC AACTGTACAA
<i>RT-U6</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC AAAAATATGGAACG

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

Таблица 5. 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
ТВЕ	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 (<i>Thermo Scientific, США</i>)	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, 1 мМ EDTA, 250 мкг/мл суммарной тРНК <i>E. coli</i>
Буфер L (<i>Bio-Rad, США</i>)	0.0625 М Трис-НСl pH 6.8, 10% глицерин, 1% LDS, 0.005% бромфеноловый синий
Буфер ТВ	47.9 мМ Трис-НСl 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-НСl pH 8.3, 0.25 М глицин, 0.1% SDS
Буфер RIPA (<i>Thermo Scientific, США</i>)	25 мМ Трис-НСl pH 7.6, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS
ОТ-буфер (<i>Биолабмикс, Россия</i>)	50 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 75 мМ KCl, 3 мМ MgCl ₂
ПЦР-буфер (<i>Биолабмикс, Россия</i>)	10 мМ Трис-НСl, pH 8.3, 50 мМ KCl, 1.2 мМ MgCl ₂
Раствор М	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 ксиленцианол

Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали воду, очищенную на установке MilliQ фирмы Millipore (США). Все буферы и растворы были стерилизованы автоклавированием или фильтрацией через нитроцеллюлозный фильтр 0.22 мкм (Millipore, США).

2.1.5. Трансфицирующие агенты и системы доставки *in vivo*

Для трансфекции клеток соединениями использовали трансфицирующий агент Lipofectamine™ 2000. Для формирования липоплексов для введения *in vivo* применяли фолат-содержащие катионные липосомы F [277], предоставленные д.х.н., проф. М. А. Масловым (Российский технологический университет МИРЭА, Москва).

2.1.6. Клеточные культуры

Клетки меланомы мыши В16 были получены из банка клеточных культур Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Блохина Н.Н (Москва). Клетки карциномы легких человека А549, 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. О. А. Коваль, 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'-метиленбисакриламид = 29/1 в буфере TBE при 4 °C 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'-метиленбисакриламид = 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 миРНК с использованием полинуклеотидкиназы

Введение радиоизотопной метки γ -[³²P] по 5'-ОН миРНК проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 0.2 мКи γ -[³²P]-АТФ, 10 ед. акт. Т4 полинуклеотидкиназы, 4 мкг миРНК и Т4-ПНК-буфер, при 4 °C в течение ночи. 5'-[³²P]-миРНК выделяли с помощью электрофореза в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. По окончании электрофореза полосы геля, содержащие меченые миРНК, визуализировали с помощью радиоавтографии и вырезали из геля. Меченую миРНК элюировали в 300 мкл 0.3 М ацетата натрия в присутствии 15%-ного кислого фенола (рН=5.2), затем осаждали 3-4 объемами этилового спирта при -20 °C в течение 18 ч. Раствор центрифугировали при 13000 об/мин в течение 15 мин, осадок промывали 3 – 4 объемами 75%-ного этилового спирта, высушивали, растворяли в воде и хранили при -20°C.

2.2.4. Гибридизация олигонуклеотидов и миРНКаз с миРНК

Гибридизацию проводили в реакционной смеси объёмом 4 мкл, содержащей 100 имп/мин 5'-[³²P]-миРНК, миРНК 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. В реакционную смесь добавляли 4 мкл раствора F и анализировали методом задержки в 15%-ном нативном ПААГ. Непосредственно после остановки реакции образцы вносили в гель идущего при температуре 4 °C электрофореза с интервалом 1 мин. Анализ проводили, как описано далее в п. 2.2.9.

2.2.5. Расщепление миРНК с помощью миРНКаз

Расщепление РНК под действием миРНКаз или олигонуклеотидов исследовали в условиях однооборотной и многооборотной реакций. Реакционную смесь, содержащую 80 имп/мин на одну пробу 5'-[³²P]-меченой миРНК, миРНК в концентрации 1 мкМ и миРНКазу в концентрации

5 или 20 мкМ (однооборотная реакция) или миРНК в концентрации 10 мкМ и миРНКазу в концентрации 5 мкМ (многооборотная реакция), инкубировали в буфере I или буфере II при 37 °С в течение 48 или 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. 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 Т1 и 2 М имидазола (см. далее п. 2.2.8.). Анализ реакции проводили, как описано далее в п. 2.2.9.

2.2.6. рН-зависимое расщепление миРНК под действием двойных миРНКаз

рН-зависимое расщепление миРНК-17 и миРНК-18а под действием двойных миРНКаз анализировали в диапазоне рН от 3.7 до 9.5 в буферных растворах, содержащих 100 мМ КСl, 1мМ DTT, 2 мМ MgCl₂ и компонент с перекрывающимися значениями рН: 50 мМ ацетат натрия (SA) с рН 3.7 – 5.0; 50 мМ хлорид 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES-HCl) с рН 4.5 – 6.0; 50 мМ калиевая соль 1,3-бис[трис(гидроксиметил)метиламино]пропана (BTP-KOH) с рН 6.0 – 9.5; 50 мМ хлорид трис(гидроксиметил)аминометана (Трис-HCl) с рН 7.0 – 9.0. Реакционную смесь (8 мкл), содержащую 320 имп/мин 5'-[³²P]-миРНК, миРНК в концентрации 1 мкМ и миРНКазу 17-DC в концентрации 10 мкМ или 18а-DC в концентрации 20 мкМ, инкубировали в одном из буферов при 37 °С в течение 48 ч. В качестве контроля миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз в буфере, содержащем Трис-HCl с рН 7.0. Продукты гидролиза анализировали, как описано далее в п. 2.2.9.

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

Реакционную смесь, содержащую 80 имп/мин на одну пробу 5'-[³²P]-миРНК, миРНК в концентрации 1 мкМ и миРНКазу или олигонуклеотид в концентрации 20 мкМ (однооборотная реакция) или миРНК 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 48 или 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 реакционную смесь того же состава в присутствии РНКазы H1 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 миРНК в денатурирующих условиях

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

Т1-лэддер

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 5'-[³²P]-миРНК (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 миРНК добавляли 5 ед. акт. РНКазы T1 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]-миРНК (1000 имп/мин) и 9 мкл буфера E, 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 M.

2.2.9. Анализ эффективности гибридизации и расщепления миРНК

После проведения реакции гибридизации или расщепления гели высушивали с использованием вакуумной системы при 80 °С 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 миРНК определяли как отношение интенсивности полосы комплекса миРНК-миРНКазы к сумме интенсивностей полос, соответствующих комплексу и несвязанной миРНК. Степень расщепления миРНК определяли, как отношение суммарной интенсивности полос образовавшихся фрагментов миРНК к суммарной интенсивности всех фрагментов, включая нерасщепленную миРНК. Накопление отдельного фрагмента расщепленной миРНК оценивали как отношение интенсивности полосы фрагмента к суммарной интенсивности всех фрагментов, включая нерасщепленную миРНК.

Константу комплексообразования рассчитывали по формуле:

$$K_a = \frac{\alpha}{[\text{миРНКазы}]_0 (1-\alpha) \left(1 - \alpha \left(\frac{[\text{миРНК}]_0}{[\text{миРНКазы}]_0} \right) \right)},$$

где α доля связанной РНК; $[\text{миРНК}]_0$ и $[\text{миРНКазы}]_0$ – исходные концентрации миРНК 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 – максимальная степень расщепления.

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

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 °С в течение 24-72 ч. Аликвоты объемом 10 мкл отбирали через 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 и 72 ч инкубации. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 8 М мочевины и смесь 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.

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. Затем липоплексы добавляли к клеткам. Крабоподобные миРНКазы использовали в концентрации 1 мкМ, а вилкоподобные миРНКазы – в концентрации 10 – 200 нМ для анализа антипролиферативной активности и 50 нМ для проведения ПЦР и оценки миграционной активности клеток.

Для исследования противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз *in vivo* использовали фолат-содержащие катионные липосомы F [277]. Комплексообразование миРНКаз и липосом F проводили при соотношениях N/P (соотношение количества азотов катионного липида и липида-хэлпера липосом к количеству 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, A549, B16, hFF3, KB-3-1 и KB-8-5 проводили в присутствии трансфицирующего агента Lipofectamine™2000 согласно протоколу производителя. За день до трансфекции клетки высаживали в планшеты в среде, не содержащей антибиотиков.

Приготовление липоплексов проводили как описано в п. 2.2.11. Трансфекцию клеток проводили в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37 °С 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 °С. 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 °С, в течение 15 мин, фазу отбирали, добавляли к ней изопропиловый спирт в объеме, составляющем 1/2 от объема TRIzola, и инкубировали при –20 °С в течение 18 ч. Осадок РНК отделяли центрифугированием при 13000 об/мин, 4 °С, в течение 20 мин, промывали 75%-ным этанолом, высушивали, растворяли в воде, хранили при –20 °С. 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 миРНК в опухолевых клетках методом количественной ОТ-ПЦР

Определение уровней миРНК в клетках после трансфекции миРНКазми или олигонуклеотидами проводили методом обратной транскрипции с использованием специфических к миРНК шпилечных праймеров с последующей количественной полимеразной цепной реакцией (“stem-loop PCR”) [278]. Последовательности праймеров для реакций обратной транскрипции и количественной ПЦР указаны в Таблице 4 и Таблице 5, соответственно.

2.2.14.1. Обратная транскрипция с использованием специфических шпилечных праймеров

Для синтеза кДНК использовали суммарную РНК клеток, выделенную, как описано в п. 2.2.14. кДНК получали в реакционной смеси объёмом 30 мкл, содержащей ОТ-буфер, 3 мкг суммарной клеточной РНК, 0.2 мМ специфического праймера (Таблица 4) и 1.5 единиц обратной транскриптазы M-MuLV-RN. 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 объема 300 мкл.

2.2.14.2. ПЦР в режиме реального времени

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкл полученной кДНК, 5 мкл 1мМ специфических праймеров (Таблица 5) 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 миРНК определяли методом $\Delta\Delta C_T$ с нормализацией по малой ядерной РНК (мяРНК) U6.

2.2.15. Исследование влияния миРНКаз на выживаемость клеток методом WST и МТТ

Опухолевые клетки В16, MCF-7, A549, KB-8-5, KB-3-1 и нетрансформированные клетки фибробластов hFF3 высаживали в 96-лучночные планшеты по 5×10^3 клеток на лунку. На следующие сутки проводили трансфекцию крабоподобными и вилокподобными миРНКазами в концентрации 1 мкМ или 0.01 – 0.2 мкМ, соответственно, 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. Для исследования пролиферации клеток методом WST через 72 ч инкубации в каждую лунку добавляли реагент WST-1 в объеме 1/10 от объема клеточной среды. Затем клетки В16 и A549 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. Для исследования пролиферации клеток методом МТТ через 72 ч инкубации среду отбирали, 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. Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

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

Исследование пролиферации клеток MCF-7 и A549 регистрировали в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Для этого опухолевые клетки высаживали в 16-ти луночные планшеты E-Plate по 5×10³ клеток на лунку. На следующие сутки проводили трансфекцию клеток крабоподобными конъюгатами 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.

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

Для приготовления лизата опухолевые клетки MCF-7, трансфицированные миРНКазами, промывали стерильным физиологическим раствором, а затем лизировали в буфере RIPA в объёме 100 мкл. Фрагменты опухоли KB-8-5 гомогенизировали в 500 мкл лизирующего буфера RIPA с добавлением 0.5 г лизирующей матрицы с помощью гомогенизатора FastPrep-24™ 5G с адаптером QuickPrep 24 в течение 40-80 сек. Затем супернатант отбирали и хранили при –20 °С.

К полученному лизату (15 мкл) добавляли 5 мкл буфера L (4x) с 10% β-меркаптоэтанола, прогревали в течение 10 мин при 95 °С 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 1.5 ч. После электрофореза белки переносили на мембрану Immobilon-P PVDF в буфере TB с применением мокрого элетроблоттинга Criterion Blotter. 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 °С в течение 18 ч с первичными моноклональными антителами к белкам PDCD4 (1/800), GAPDH (1/8000), E2F1 (1/400), E-кадгерин (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. Через 1 ч мембрану промывали в буфере TBST 3 раза по 10 минут. Люминесцентную детекцию проводили с помощью готового раствора субстрата для пероксидазы хрена на приборе iBright FL1500 Imaging System. Анализ интенсивности полос определяли с помощью системы iBright Analysis Software.

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% CO_2 при 37 °С. 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 72 ч клетки фотографировали с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert при 4-х-кратном увеличении. Фотографии клеток обрабатывали с помощью программы ImageJ. Степень заращения «царапины» (v) оценивали по формуле $v = (1-X) \times 100\%$, где X – отношение ширины «царапины» через 72 ч к ширине «царапины» в 0 ч.

2.2.20. Исследование противоопухолевой активности крабоподобных миРНКаз *ex vivo*

Оценку противоопухолевого эффекта крабоподобных миРНКаз проводили с использованием модели аденокарциномы молочной железы MCF-7. Для этого анализировали четыре группы клеток: (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 протоколам 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 солидных опухолей. 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 собраны для дальнейшего гистологического анализа

2.2.21. Исследование биораспределения вилокподобного олигонуклеотида *in vivo*

Анализ биораспределения Су5.5-меченого вилокподобного 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 перитуморально (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) на длинах волн 620 и 700 нм (время экспозиции 10 с) с помощью системы *in vivo* визуализации IVIS Lumina X5. 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.

2.2.22. Конфокальная микроскопия криосрезов опухоли

Через 24 ч после введения Cy5.5-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 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента обработки. Срезы толщиной 10 мкм готовили с использованием криостата Microm HM 505N при температуре $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Криосрезы окрашивали DAPI, разведенном в PBS в соотношении 1/100, в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали PBS. Окрашивание цитоскелета проводили с использованием реагента CytoPainter Phalloidin-iFluor 488 в соответствии с протоколом производителя. Затем срезы помещали в среду ProLong Gold Antifade Mountant.

Криосрезы исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 с объективами Plan-Apochromat 10×/0.45 и Plan-Apochromat 63×/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 Cy5.5-меченного 21-F-ON. Конфокальные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ZEN Black Edition v. 8.1.

2.2.23. Противоопухолевая активность вилкоподобных миРНКаз *in vivo*

Для исследования противоопухолевой активности вилкоподобных миРНКаз использовали ксенографтную модель карциномы человека KB-8-5 на мышах 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 рандомизировано разделены на 3 группы (n=5 в группе): (1) контроль – мыши получали Opti-MEM; (2) мыши получали инъекции контрольного конъюгата Scr-FC-ββ в дозе 5 мкг; (3) мыши получали миРНКазу 21-FC-ββ в дозе 5 мкг. Формирование комплексов F с миРНКазами проводили при соотношении N/P = 2/1 как описано в п. 2.2.11, а

затем перитуморально 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 экспериментов, обезживали последовательной инкубацией в возрастающих концентрациях этанола и ксилола, а затем погружали в парафин HISTOMIX. Парафиновые срезы опухолей и внутренних органов толщиной 5 мкм, полученные с использованием микротомы Microm HM 355S, 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, каспазе-3 или PDCD4 согласно протоколу производителя. Полученные образцы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, добавляли готовый раствор субстрата для пероксидазы хрена, а затем окрашивали гематоксилином Майера. Изображения образцов получали с помощью микроскопа Axiostar Plus, дополненным AxioCam MRc5 камерой ($\times 400$ 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 (N_v) митозов и каспаза-3-позитивных клеток, а также объёмной плотности (V_v , %) 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 8.4.3.

3. МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность (результаты и обсуждение)

3.1. Дизайн миРНК-направленных искусственных рибонуклеаз

Первые представления о каталитическом потенциале пептидов с чередующимися гидрофобными и основными аминокислотами были сформированы в конце 1980-х годов в работах Б. Барбье и А. Брака. Авторами было показано, что полипептиды с регулярным чередованием Leu и Arg (poly(LR)) значительно ускоряют щелочной гидролиз олигорибонуклеотидов, причем регулярность аминокислотной последовательности имеет принципиальное значение, поскольку обеспечивает формирование структуры β -слоев, способствующей оптимальной для катализа ориентации функциональных групп [279,280]. В ходе этих исследований также было установлено, что в щелочных условиях даже короткие пептиды длиной 10 аминокислот обладают выраженной каталитической активностью в отношении РНК [281].

Данные результаты послужили основой для создания иРНКаз, сочетающих в единой структуре каталитически активный пептид и олигонуклеотид. В 1997 г. в работе Д. В. Пышного и соавт. впервые было показано, что конъюгаты пептида $(LR)_nG-NH_2$ с ковалентно присоединенным 6-звенным олигодезоксирибонуклеотидом эффективно расщепляют комплементарную 14-звенную синтетическую РНК, причем максимальная активность наблюдалась при $n=4$ [282]. Одновременно с этим было установлено, что свободные пептиды, а также пептиды в смеси с олигонуклеотидами были неактивны в исследуемых условиях, что свидетельствует о том, что каталитическая активность короткого пептида проявляется только при его структурной стабилизации присоединенным олигонуклеотидом, формирующим необходимую конформацию. В реакции с более длинным РНК-субстратом – тРНК^{Phe} – такие конъюгаты расщепляли РНК не только вблизи сайтов связывания, но и в отдаленных участках молекулы. Это послужило основанием для дальнейших исследований Н. Л. Мироновой и соавт., направленных на изучение конъюгатов с пептидом $(LR)_4G$ и олигонуклеотидами, не имеющими комплементарных областей в последовательностях РНК-субстратов [260,283–285]. Было показано, что такие конструкции эффективно расщепляют РНК в одноцепочечных областях и в зависимости от последовательности и длины олигонуклеотида могут демонстрировать различную нуклеотидную специфичность. Наиболее активные конъюгаты $G(RL)_4$ -pCCAACA и TTTT-(LR)₄G расщепляли транскрипты тРНК^{Lys} человека и фрагмента РНК HIV-1 с преобладанием G-X специфичности, тогда как такие структурные варианты, как $G(RL)_4$ -pTCAA и $G(RL)_4$ -pDEG-CCCTGGACCCTCAGAT, обеспечивали преимущественно гидролиз P_{ug}-A

связей [260,283–285]. Продолжением этой серии работ стала разработка конъюгата пер-9, который состоял из пептида (LR)₄G-NH₂, линкера из трёх остатков дезоксирибозы и 9-звенного олигонуклеотида GGATCTCTT и проявлял исключительно G-X специфичность, являясь искусственным аналогом РНКазы T1 [259].

Дальнейшие исследования были сосредоточены на разработке сиквенс-специфических иРНКаз, предназначенных для расщепления модельных тРНК, в частности направленных на ТΨС-область тРНК^{Phe} дрожжей [265,269,270,286]. В этих работах было установлено, что введение остатка глицина в пептид (LRLRG)₂ существенно повышает его каталитическую активность. С использованием этого пептида были разработаны сиквенс-специфические иРНКазы нового дизайна: двойные иРНКазы, в которых каталитический пептид был фланкирован двумя короткими направляющими олигонуклеотидными доменами [269], и петлеобразующие иРНКазы, в которых пептид был расположен в центральной части олигонуклеотида, формирующего петлю в целевой тРНК при связывании с ней [270,286].

Основным механизмом расщепления РНК под действием иРНКаз является внутримолекулярная реакция трансэтерификации фосфодиэфирной связи (Рис. 9). Предполагается, что этот процесс может катализироваться синхронизированным действием гуанидиновых групп остатков Arg, которые формируют гуанидин-гуанидиновые каталитические диады, функционирующие как кислотно-основные пары [286,287].

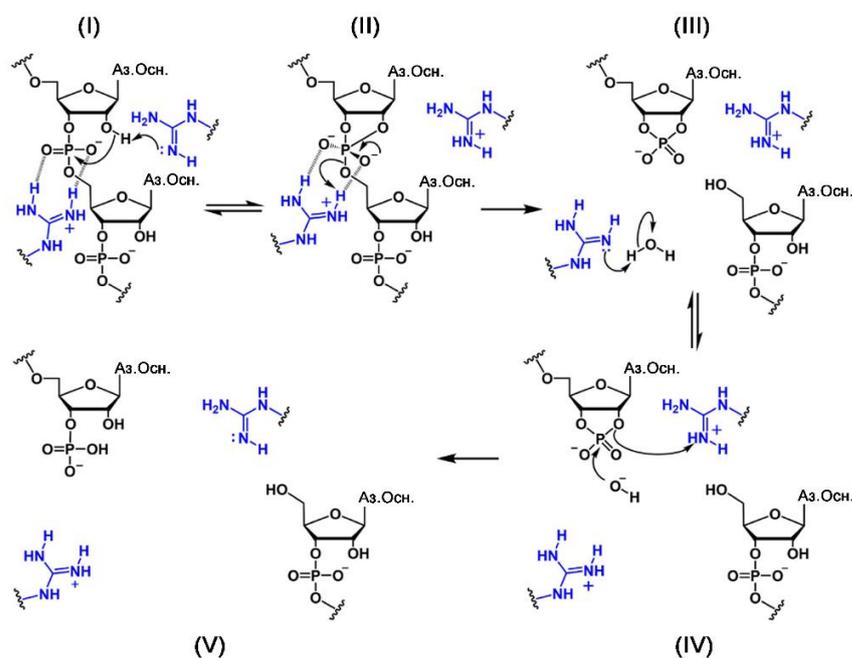


Рис. 9. Предполагаемый механизм расщепления РНК под действием иРНКаз с пептидным доменом, содержащим остатки Arg. На схеме выделены основные стадии (I-V), включающие внутримолекулярную трансэтерификацию фосфодиэфирной связи РНК, катализируемую синхронизированным действием гуанидиновых групп остатков аргинина пептидного домена иРНКазы, и последующий гидролиз 2',3'-циклофосфата. Рисунок адаптирован из [286].

Нейтральная гуанидиновая группа выступает в роли общего основания, депротонируя 2'-ОН рибозы (Рис. 9 I, II). Активация 2'-ОН приводит к её внутримолекулярной нуклеофильной атаке на атом фосфора с образованием пятикоординационного переходного комплекса (Рис. 9 II). Одновременно с этим протонированная гуанидиновая группа электростатически стабилизирует отрицательно заряженную фосфатную группу и способствует протонированию 5'-О уходящей рибозы (Рис. 9 I, II). В результате происходит трансэтерификация с образованием 2',3'-циклофосфата и фрагмента РНК, содержащего 5'-ОН группу (Рис. 9 III). На следующей стадии 2',3'-циклофосфат подвергается гидролизу с образованием линейного фосфатного продукта (Рис. 9 IV, V). В этом процессе депротонированная гуанидиновая группа вновь выполняет функцию общего основания, активируя молекулу воды, которая осуществляет нуклеофильную атаку циклофосфата и приводит к его раскрытию. Гуанидиновые группы остатков аргинина дополнительно стабилизируют переходные состояния реакции и по завершении каталитического цикла регенерируют, обеспечивая возможность многократного оборота реакции.

Совокупность накопленных данных позволила перейти к разработке сиквенс-специфических иРНКаз, направленных на биологически значимые РНК. В ИХБФМ СО РАН совместно с Университетом Манчестера были разработаны иРНКазы, адресованные к онкогенным миРНК (миРНК-17 и миРНК-21) – миРНКазы. Первые разработанные миРНКазы представляли собой конъюгаты, состоящие из адресующего шпилечного олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного 5'-концу миРНК-мишени, и пептида на основе чередующихся остатков лейцина и аргинина (LR)₄ или (LRLRG)₂ [45,46]. Было показано, что разработанные соединения осуществляли эффективное сиквенс-специфическое расщепление 3'-терминальной области миРНК-мишеней, что приводило к их ингибированию в опухолевых клетках и обеспечивало выраженный противоопухолевый эффект [32,45,46].

В данной диссертационной работе были сконструированы и исследованы четыре серии миРНКаз новой структуры, направленные к различным функциональным областям миРНК. Были разработаны двойные миРНКазы DC (от англ. Dual conjugate) с каталитическим пептидом, расположенным между двумя короткими адресующими доменами и способным расщеплять миРНК в её центральной области и в 3'-области дополнительных взаимодействий (Рис. 10 А); петлеобразующие миРНКазы BC (от англ. Bulge-forming conjugate) с одним или двумя каталитическими пептидами, расположенными в составе внутреннего участка адресующего олигонуклеотида, для разрушения мишени в её центральной области (Рис. 10 Б); крабоподобные миРНКазы SC (от англ. Crab-like conjugate), в которых два каталитических пептида расположены по концам короткой адресующей компоненты для расщепления миРНК, как в затравочной области, так и в 3'-терминальных областях (Рис. 10 В); и вилокподобные 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 миРНК-мишени (Рис. 10 Г).

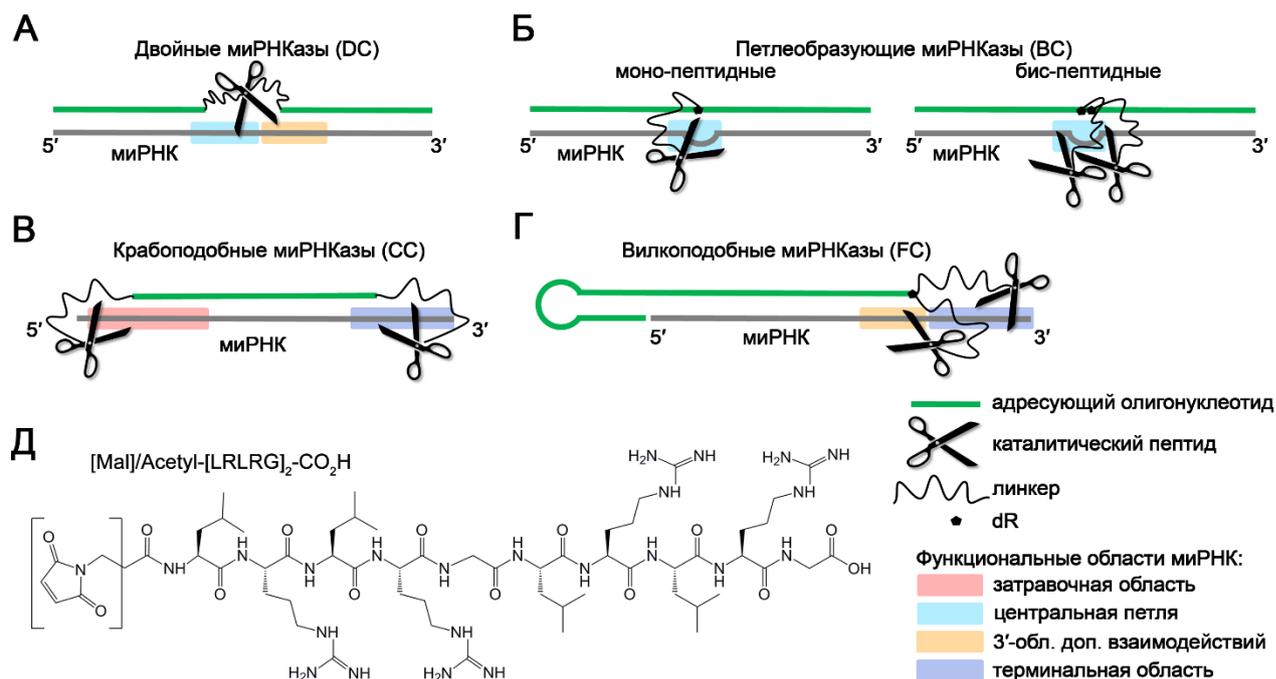


Рис. 10. Схематичное представление комплексов миРНК с миРНКазами различной структуры: двойные (А), петлеобразующие (Б), крабоподобные (В) и вилкоподобные (Г) миРНКазы. Цветными прямоугольниками выделены функциональные области миРНК, на которые направлено действие каталитических пептидов миРНКаз. Д – химическая структура каталитического пептида (LRLRG)₂, содержащего на N-конце малеимидную группу (Mal) для синтеза двойных конъюгатов или ацетильную группу (Acetyl) для синтеза петлеобразующих, крабоподобных и вилкоподобных миРНКаз.

Олигонуклеотидные компоненты миРНКаз были сконструированы для направленного воздействия на онкогенные миРНК миРНК-21, миРНК-17, миРНК-18а и миРНК-155, ассоциированные с развитием широкого спектра онкологических заболеваний [288–295].

В качестве каталитического компонента в разработанных миРНКазах был использован ранее исследуемый короткий амфифильный пептид (LRLRG)₂ [32,45,46,265,269,270,286], состоящий из чередующихся аминокислотных остатков Arg и Leu, а также двух остатков Gly для обеспечения его конформационной гибкости (Рис. 10 Д).

Синтез и полная характеристика миРНКаз была проведена в Университете Манчестера под руководством к.х.н. 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 ранее для сиквенс-специфического расщепления модельной тРНК^{Phe} дрожжей [269]. В рамках настоящей работы этот структурный принцип был применен для создания рибонуклеаз, специфически нацеленных на клинически значимые онкогенные миРНК-21, миРНК-18а, миРНК-17 и миРНК-155.

Двойные миРНКазы состояли из двух коротких миРНК-адресующих олигодезоксирибонуклеотидов А и Б и каталитического пептида, расположенного между ними таким образом, чтобы при связывании с миРНК образовывался одноцепочечный участок в центральной области мишени длиной 5 н. (Рис. 11; Таблица 3). Пептид Mal-(LRLRG)₂-COOH 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. 11 Б). Ранее в работе [269] было показано, что одноцепочечная область длиной 5 н. обладает достаточной гибкостью, а аминокетильные линкеры обеспечивают необходимую конформационную подвижность пептида для эффективного расщепления РНК. Данный дизайн обеспечивает локализацию пептида напротив области центральной петли миРНК.

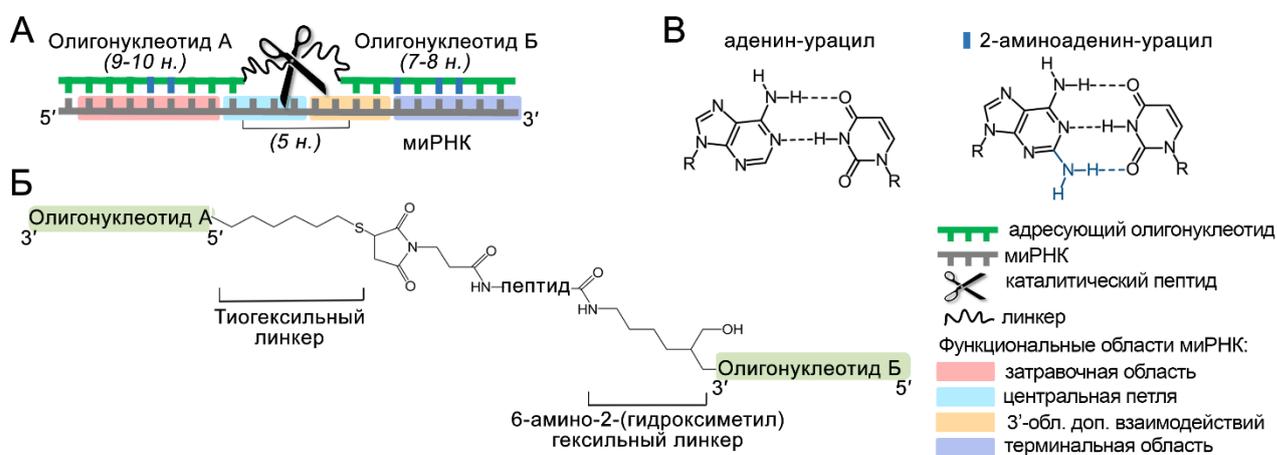


Рис. 11. Дизайн двойных миРНКаз (DC). **А** – структура комплексов DC с миРНК-мишенью. Синим выделены основания 2-аминоаденинов. **Б** – схематичное изображение структуры DC, в которой пептид соединен с двумя олигонуклеотидами посредством тиогексильного и 6-амино-2-(гидроксиметил)гексильного линкеров. Пептид – Mal-(LRLRG)₂-COOH. **В** – структура пар аденин-урацил и 2-аминоаденин-урацил.

Поскольку короткая длина зрелых миРНК лимитирует протяженность адресующих мотивов до 7 – 10 н., олигонуклеотидные «плечи» в DC были усилены введением замены аденинов на 2-аминоаденины для увеличения сродства к мишени (Рис. 11 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 [296,297], тем самым увеличивая общую стабильность комплекса. Дополнительным преимуществом 2-аминоаденина является повышение специфичности: миссматч в положении напротив этого нуклеотида приводит к снижению температуры плавления дуплекса на 7 – 15 °С [298], обеспечивая селективное связывание только с полностью комплементарными мишенями.

В данной работе были сконструированы двойные конъюгаты 17-DC, 18a-DC, 21-DC и 155-DC, направленные к онкогенным миРНК миРНК-17, миРНК-18a, миРНК-21 и миРНК-155, последовательности и структура которых приведены в Таблице 3.

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 [248,257,299–304]. Однако до недавнего времени эффективность расщепления петлевых участков пептидными искусственными рибонуклеазами не изучали. Расщепление РНК в области петли под действием различных иРНКаз было всесторонне исследовано на модельном РНК субстрате – тРНК^{Phe} дрожжей в работах Staroseletz и Amirloo [270,286]. В данных работах было установлено, что петля длиной 3 – 5 н., формируемая при гибридизации иРНКаз с РНК, является оптимальной для обеспечения эффективного расщепления РНК с сохранением высокой эффективности связывания [270,286]. Кроме того, было показано, что в структуре петлеобразующих соединений, направленных к тРНК^{Phe}, пространственное положение пептида относительно фосфодиэфирных связей в области петли РНК имеет важное значение [270]. Для обеспечения конформационной гибкости каталитический пептид должен быть присоединён посредством аминоксильного линкера в α - или β -положении к С1'-атому безосновной дезоксирибозы (далее по тексту – дезоксирибоза или dR) [270]. Дополнительно было установлено, что введение двух каталитических пептидов в структуру конъюгата через два остатка дезоксирибозы значительно повышает скорость расщепления РНК-мишени [286]. В рамках настоящей работы эта концепция была применена для разработки петлеобразующих миРНКаз (BC), направленных к терапевтически значимым мишеням – миРНК-21 и миРНК-17.

МиРНК-направленные BC представляли собой соединения, состоящие из олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного миРНК-мишени, при гибридизации с которым в центральной области миРНК образуется тринуклеотидная петля, и одного или двух пептидов, расположенных напротив формируемой петли (Рис. 12 А; Таблица 3).

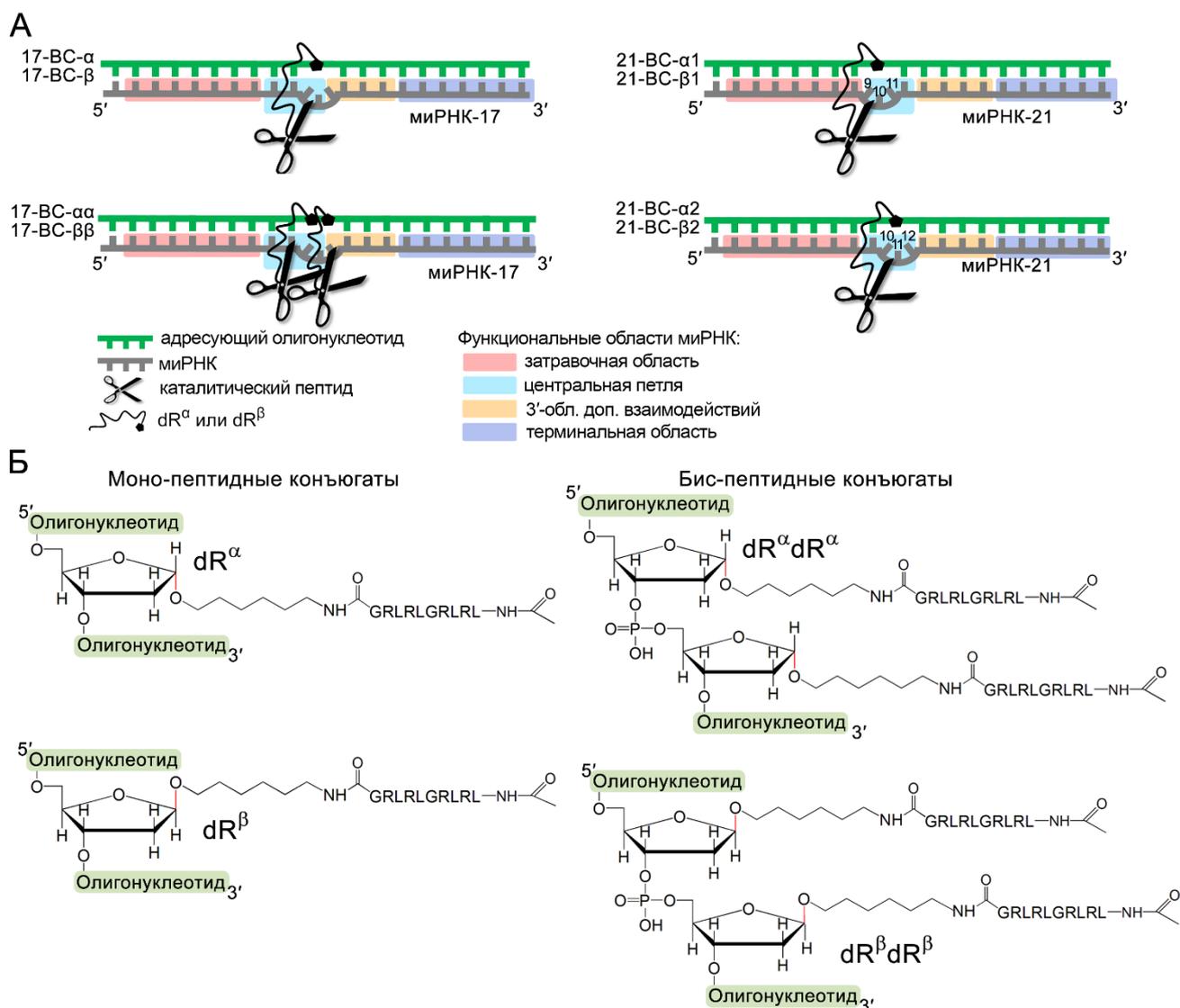


Рис. 12. Дизайн петлеобразующих миРНКаз (BC). **А** – структура комплексов BC с миРНК-17 и миРНК-21. **Б** – схема присоединения пептидов в моно- и бис-пептидных BC, в которых один или два каталитических пептида Acetyl-(LRLRG)₂-COOH присоединены к олигонуклеотиду через аминоксильный линкер посредством остатков дезоксирибозы в альфа (dR^α) или бета (dR^β) 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 адресующих олигонуклеотидов с их миРНК-мишенями с использованием сервиса DINAMelt (www.unafold.org). Примеры предсказанных структур и рассчитанные значения термодинамических параметров представлены на Рис. 13. 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. 13 А и Г). Формирование тринуклеотидной петли при гибридизации миРНК-17 с петлеобразующим олигонуклеотидом 17-В-ОН-Р, содержащим один остаток дезоксирибозы, способствует дестабилизации дуплекса, снижая T_m почти на 15 °С по сравнению с полностью

комплементарным вариантом (Рис. 13 А и Б), а для комплексов миРНК-21 с олигонуклеотидами 21-В-ОН-R1 и 21-В-ОН-R2, содержащими один остаток дезоксирибозы в разных положениях в последовательности, наблюдалось ещё более выраженное снижение температуры плавления, на 19 °С (Рис. 13 Д и Е). Введение двух остатков дезоксирибозы в структуру олигонуклеотида 17-В-ОН-RR способствовало повышению эффективности гибридизации с миРНК, предположительно, за счёт снижения конформационного напряжения в области петли (Рис. 13 В). Несмотря на заметное снижение T_m комплексов разработанных олигонуклеотидов с мишенями, они способны сохранять достаточную стабильность для функционирования в физиологических условиях.

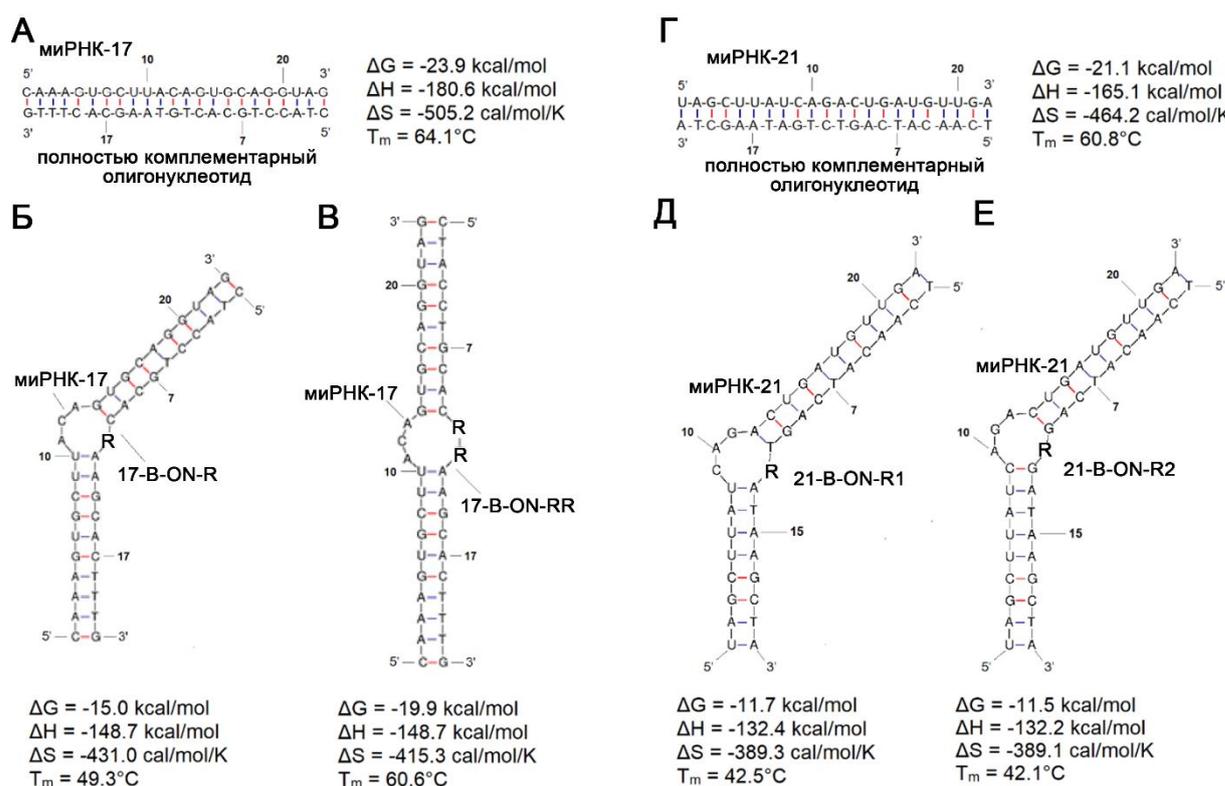


Рис. 13. Предсказанные комплексы миРНК-17 (А – В) или миРНК-21 (Г – Е) с полностью или частично комплементарными к мишеням олигонуклеотидами. Вторичная структура и термодинамические параметры (T_m , ΔG , ΔH и ΔS) были рассчитаны с использованием сервиса DINAMelt (www.unafold.org). R – остаток дезоксирибозы.

Конъюгирование сконструированных олигонуклеотидов с каталитическим пептидом Acetyl-(LRLRG)₂-COOH осуществляли путем амидного присоединения С-концевой карбоксильной группы к аминогруппе аминокислотного линкера. При этом принципиальным аспектом конструирования было варьирование стереохимии присоединения линкера к С1' атому дезоксирибозы в α - или β -конфигурации (dR^α или dR^β) (Рис. 12 Б). Такой дизайн обеспечивал возможность оценки влияния различной пространственной ориентации пептида на эффективность расщепления петлевых структур миРНК.

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. 12). 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, в которых варьировалось положение 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 н. адресующего 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. 12 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. 12). 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 миРНК 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 миРНК может способствовать дополнительной дестабилизации функционального комплекса миРНК/AGO2 и увеличению скорости расщепления мишени. Разработанные СС были направлены к миРНК-21 и миРНК-17.

Крабоподобные миРНКазы были сконструированы на основе укороченного 13-звенного олигонуклеотида (Рис. 14, Таблица 3), что позволяет обеспечить оптимальный баланс между специфичностью связывания с мишенью и способностью к быстрому высвобождению продуктов расщепления для реализации эффективного многооборотного каталитического режима.

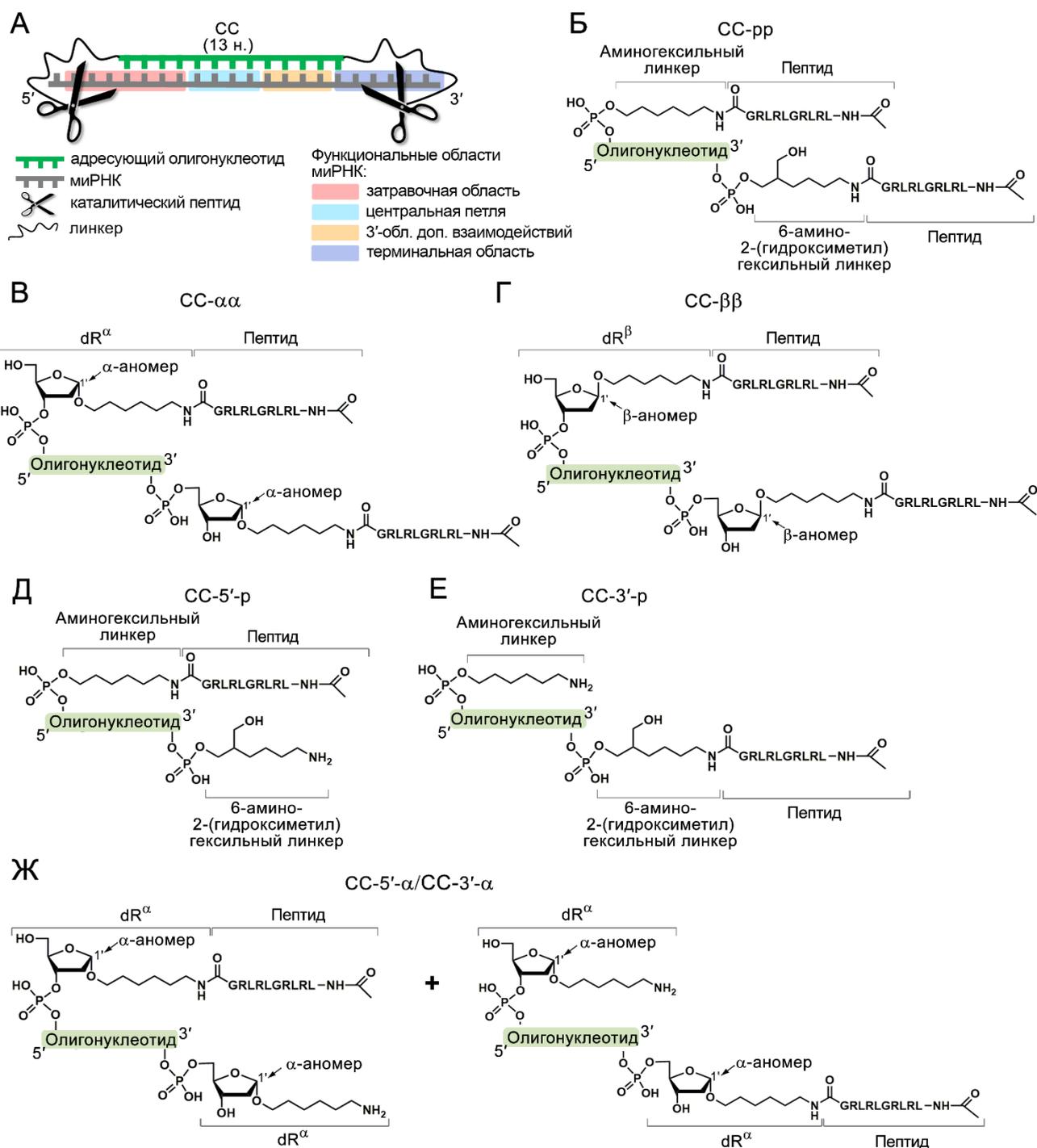


Рис. 14. Дизайн крабоподобных миРНКаз (СС). **А** – структура комплекса СС с миРНК. **Б** – структура миРНКазы СС-pp, в которой каталитические пептиды присоединены через аминогексильный линкер к 5'-фосфату через 6-амино-2(гидроксиметил)гексильный линкер к 3'-фосфату адресующего олигонуклеотида. **В, Г** – структуры миРНКаз типа СС-αα и СС-ββ, в которых пептиды через аминогексильный линкер присоединены к аномерному атому С1' остатка дезоксирибозы, расположенному на 5'- и 3'-концах олигонуклеотида, в α- (**В**) или β-ориентации (**Г**). **Д, Е** – структуры моно-пептидных СС, в которых пептид присоединён либо через аминогексильный линкер к 5'-фосфату (**Д**), либо через 6-амино-2(гидроксиметил)гексильный линкер к 3'-фосфату (**Е**) адресующего мотива. **Ж** – структура побочных продуктов синтеза СС-5'α/СС-3'α, представляющих собой смесь двух рибонуклеаз с одним пептидом, в которых каталитических домен присоединен через аминогексильный линкер к аномерному С1' атому

остатка дезоксирибозы, расположенному на 5'- или 3'-конце олигонуклеотида, в α -ориентации. Пептид – Acetyl-(LRLRG)₂-COOH.

На этапе дизайна с использованием сервиса DINAMelt была проведена оценка термодинамических параметров (T_m , ΔG , ΔH и ΔS) гетеродуплексов, образуемых миРНК-17 и миРНК-21 с соответствующими адресующими олигонуклеотидами (Рис. 15). Расчётные значения T_m составили 40 °С и 48 °С для комплексов с миРНК-21 и миРНК-17, соответственно. Близость этих значений к физиологической температуре (37 °С) может обеспечить высокую цикличность ассоциации-диссоциации гетеродуплексов *in vitro* и *in vivo*.

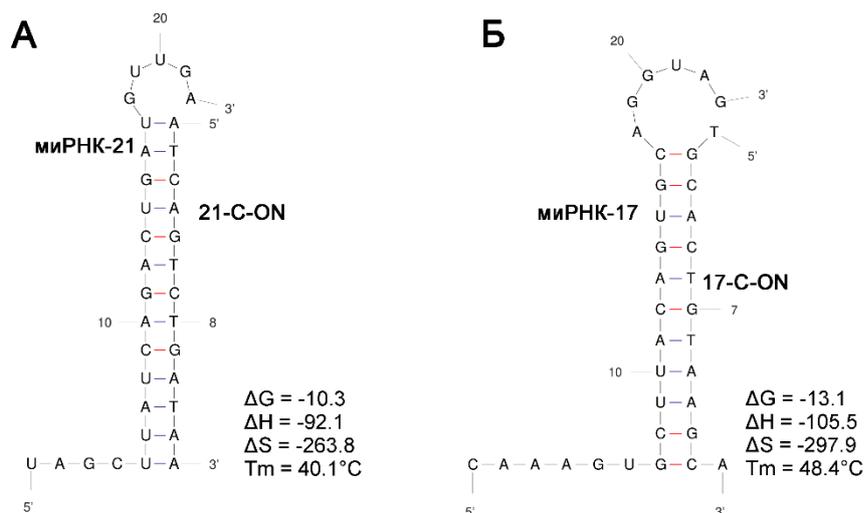


Рис. 15 Структуры и термодинамические параметры гетеродуплексов миРНК-21 (А) и миРНК-17 (Б) с соответствующими олигонуклеотидными компонентами крабоподобных миРНКаз в соответствии с сервисом DINAMelt Server (www.unafold.org).

Преимуществом крабоподобных миРНКаз является наличие двух каталитических пептидов Acetyl-(LRLRG)₂-COOH, присоединенных к 5'- и 3'-концам адресующего олигонуклеотида, что позволяет реализовать одновременное действие на две функциональные области миРНК и повысить эффективность каталитического расщепления.

Было разработано три структурных варианта крабоподобных миРНКаз, отличающихся типом присоединения пептида (Рис. 14). Во всех случаях конъюгирование осуществляли через С-концевую карбоксильную группу. Первый вариант представлял собой конъюгат, в котором два 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. 14 Б, Таблица 3). Вторым и третьим структурными вариантами представляли собой миРНКазы, в которых пептид был ковалентно присоединен к остаткам дезоксирибозы (dR), расположенным на 5'- и 3'-конце адресующего олигонуклеотида, с помощью аминогексильных линкеров, присоединённых к аномерному атому С1' в α - (структурный вариант 2, Рис. 14 В, Таблица 3) или β -конфигурации

(структурный вариант 3, Рис. 14 Г, Таблица 3). 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 3).

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 адресующего олигонуклеотида (Рис. 14 Д и Е, Таблица 3).

3.1.4. Дизайн вилкоподобных миРНКаз

Стабильность антисмысловых олигонуклеотидов в физиологических условиях является критическим фактором, определяющим их терапевтический потенциал. Помимо введения химических модификаций эффективным подходом является включение шпилечных структур на 3'-конец олигонуклеотида, который характеризуется повышенной чувствительностью к нуклеазам [305–307]. Согласно литературным данным, наличие двуцепочечного участка или шпилечной структуры на концах олигонуклеотида, комплементарного миРНК, не только стабилизирует молекулу в физиологических условиях, но также способствует вытеснению целевой миРНК из комплекса RISC, повышая эффективность ингибирования [308,309].

Используя данный принцип, в настоящем исследовании была разработана структура вилкоподобных миРНКаз (FC, от англ. Fork-like conjugate), включающая адресующий домен шпилечной структуры, который ранее использовался в дизайне высокоэффективных миРНКаз, направленных к миРНК-21 [45] (Рис. 16, Таблица 3). Олигонуклеотид содержал мини-шпильку с последовательностью GCGAAAGC, обладающую высокой устойчивостью в условиях термической и хаотропной денатурации, и обеспечивающую защиту от действия нуклеаз [310,311]. Для дополнительного повышения стабильности и нуклеазоустойчивости стебель шпильки был удлинен произвольно выбранным тетра nukлеотидом 5'-GTCA. Специфичность распознавания миРНК-мишени олигонуклеотидом обеспечивалась 14-звенным комплементарным фрагментом (Рис. 16 А). Согласно расчётам с использованием сервиса DINAMelt, такой шпилечный олигонуклеотид обладает термодинамической стабильностью с T_m 68.7 °C (Рис. 17). Экспериментально было показано, что температура плавления дуплекса миРНК-21 и исследуемого шпилечного олигонуклеотида составляет 54.7 °C, что на 7 °C выше, чем у дуплекса миРНК-21 с линейным 14-звенным олигонуклеотидом без шпильки [312]. Таким образом, шпилечная адресующая компонента обеспечивает эффективную гибридизацию и стабилизацию комплементарного комплекса с миРНК-мишенью. Разработанный олигонуклеотид связывается с миРНК 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. 16 А).

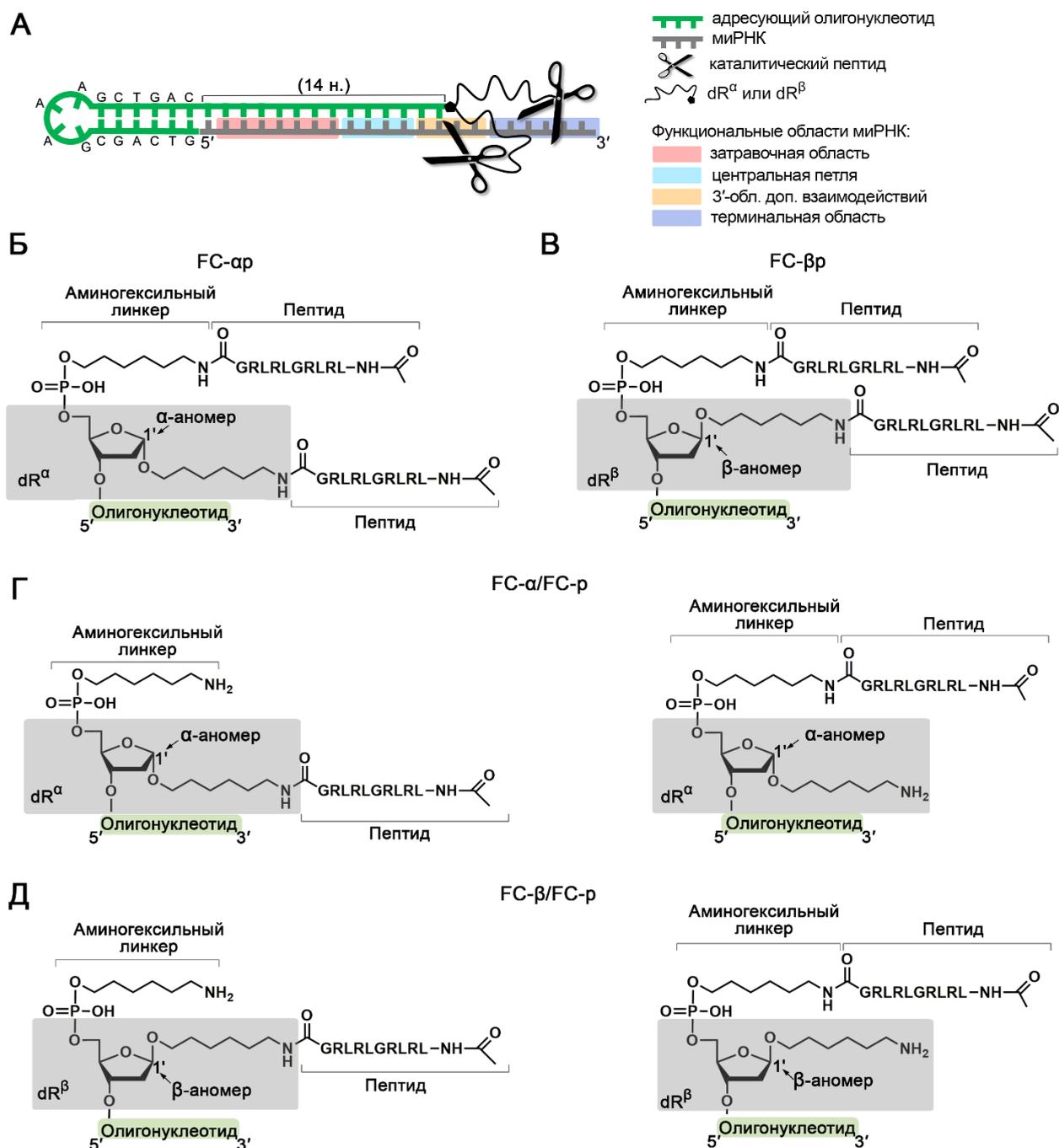


Рис. 16. Структура вилкоподобных миРНКаз (FC). **А** – структура комплекса FC с миРНК. **Б, В** – схема присоединения пептида Acetyl-(LRLRG)₂-COOH в миРНКазах 21-FC-αр (**Б**) и 21-FC-βр (**В**). Первый пептид присоединён через С-конец посредством аминогексильного линкера к 5'-фосфату остатка дезоксирибозы. Второй пептид присоединен посредством аминогексильного 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-р (**Г**) и 21-FC-β/21-FC-р (**Д**), являющихся побочными продуктами синтеза и представляющих собой смесь двух соединений с одним пептидом, статистически конъюгированным либо к dR, либо к аминогексильному линкеру,

расположенному на 5'-фосфате dR. dR^α и dR^β – остатки дезоксирибозы с аминогексильным линкером, присоединенным к аномерному C1' атому в α или β конфигурации.

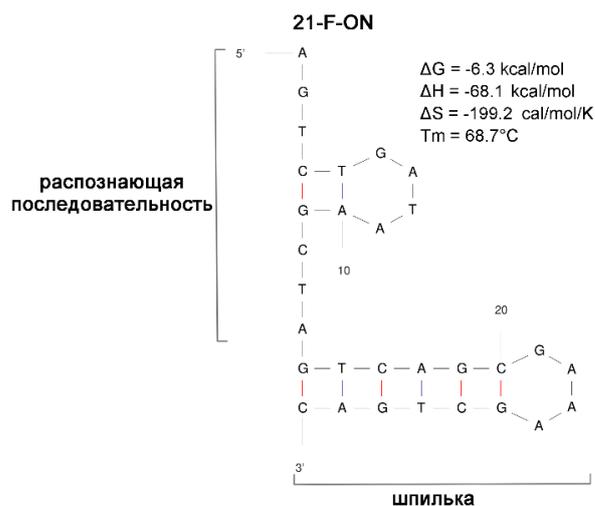


Рис. 17. Наиболее стабильная структура миРНК-21-направленного шпилечного олигонуклеотида 21-F-ON согласно сервису DINAMelt (www.unafold.org).

Для обеспечения каталитической функции в структуру вилокподобных миРНКаз было включено два пептида Acetyl-[LRLRG]₂-COOH, присоединенных к олигонуклеотиду через С-конец посредством аминогексильных линкеров, расположенных на 5'-фосфате и аномерном C1' атоме дезоксирибозы (Рис. 16 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-αр, Рис. 16 Б, Таблица 3) или β-конфигурация (21-FC-βр, Рис. 16 В, Таблица 3).

Для оценки каталитической активности вилочной структуры миРНКаз были также использованы моно-пептидные конъюгаты 21-FC-α/21-FC-р и 21-FC-β/21-FC-р (Рис. 16 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 C1' атому дезоксирибозы.

Таким образом, было сконструировано и синтезировано 4 серии миРНКаз, нацеленных на различные функциональные области миРНК-мишени. Двойные и петлеобразующие миРНКазы направлены на центральную и 3'-область дополнительных взаимодействий, крабоподобные конструкции нацелены одновременно на затравочную и терминальную области, а вилокподобные миРНКазы – преимущественно на 3'-область дополнительных взаимодействий и терминальную области миРНК. Предполагается, что выбор области адресации может определять эффективность расщепления и инактивации миРНК в условиях *in vitro* и *in vivo*.

3.2. Исследование гибридизационных свойств разработанных миРНКаз

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

Для всех типов конъюгатов, исследуемых в данной работе, была оценена эффективность комплексообразования с соответствующими миРНК-мишенями методом задержки в геле. В качестве мишеней использовали синтетические одноцепочечные миРНК, 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 миРНК 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 КСl и 1 мМ EDTA, который имитирует внутриклеточные условия и широко использовался для исследования свойств иРНКаз в ранее опубликованных работах [45,46,259,301,313]. Для ряда конъюгатов дополнительно использовали коммерческий буфер II, рекомендованный для *in vitro* реакций с участием РНКазы Н1 и содержащий 20 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 40 мМ КСl, 8 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT. Время инкубации 45 мин является достаточным для формирования комплекса миРНКазы с мишенью, однако расщепление РНК за этот период еще не происходит.

3.2.1. Исследование гибридизационных свойств двойных миРНКаз

При разработке двойных миРНКаз были проведены предварительные эксперименты по исследованию эффективности гибридизации двойных олигонуклеотидов 21-D-ON, 17-D-ON, 18а-D-ON и 155-D-ON, имитирующих структуру двойных миРНКаз и состоящих из олигодезоксирибонуклеотидов А и Б, связанных двойным триэтиленгликолевым линкером (Таблица 3). Было показано, что двойные олигонуклеотиды проявляли низкую эффективность комплексообразования (Рис. 18). При эквимольной концентрации эффективность связывания олигонуклеотидов, направленных к миРНК-18а, миРНК-155 и миРНК-17, достигала 13, 51 и 85%, соответственно, тогда как олигонуклеотид, направленный к миРНК-21, не формировал комплекса с мишенью даже при его 10-кратном избытке. В пробах, в которых миРНК инкубировали с олигонуклеотидами 18а-D-ON и 155-D-ON, наблюдается появление дополнительных продуктов, мигрирующих в нативном ПААГ с более низкой скоростью по сравнению со свободной миРНК, что, вероятно, связано с образованием несовершенных комплексов миРНК/олигонуклеотид (Рис. 18 В и Г). Для улучшения гибридизационных свойств миРНКаз аденины в последовательностях олигонуклеотидов были заменены на 2-аминоаденины (Рис. 11 А и В, Таблица 3). В состав олигонуклеотидных «плечей» миРНКазы 21-DC было введено 6 замен, в 18а-DC и 17-DC – по 2 замены, а в последовательность 155-DC – 4 замены

(Таблица 3). Количество замен определялось гибридационной активностью немодифицированных двойных олигонуклеотидов, а также количеством аденинов в последовательности олигонуклеотидных «плечей».

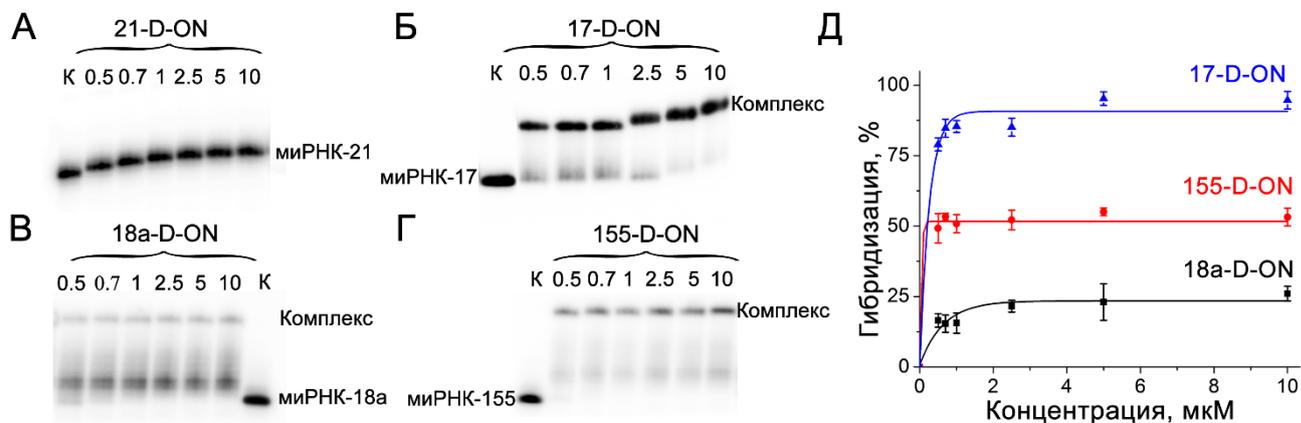


Рис. 18. Гибридизация синтетических 5'-[³²P]-миРНК с двойными олигонуклеотидами 21-D-ON, 17-D-ON, 18a-D-ON и 155-D-ON. А – Г – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации олигонуклеотидов с миРНК-21, миРНК-17, миРНК-18a и миРНК-155, соответственно. МиРНК в концентрации 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 миРНК. К – контроль, миРНК 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. 19, Таблица 3). В результате анализа было установлено, что двойные миРНКазы способны связывать миРНК-мишень со значительно более высокой эффективностью, чем одинарные аналоги. При эквимольной концентрации DC 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 конъюгатов по отношению к миРНК-мишени (Рис. 19). Для одинарных вариантов эффективность связывания не превышала 60% даже при их 10-кратном избытке (Рис. 19). Наиболее низкая эффективность комплексообразования была выявлена для двойной миРНКазы, направленной к миРНК-155 (Рис. 19 Ж и З), что может объясняться спонтанным образованием гетеродуплексов миРНК-155 из-за наличия G-богатого участка на 3'-конце миРНК.

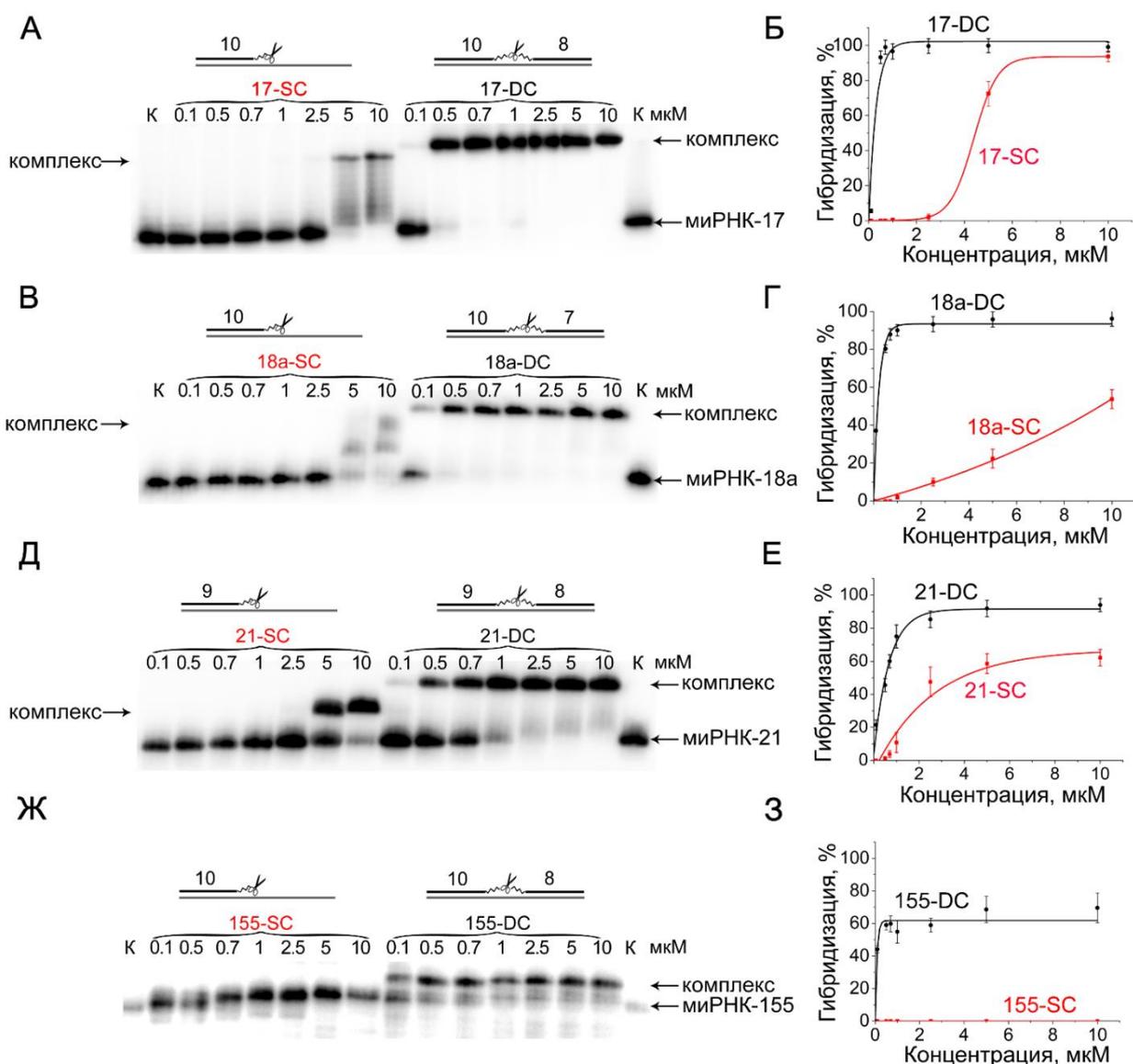


Рис. 19. Гибридизация синтетических 5'-[³²P]-миРНК с двойными (DC) и одинарными (SC) миРНКазми. **А, В, Д, Ж** – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации миРНКаз с миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-21 и миРНК-155, соответственно. МиРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с миРНКазми в концентрациях 0.1 – 10 мкМ в буфере I при 37 °С в течение 45 мин. К – контроль, миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. **Б, Г, Е, З** – концентрационные зависимости связывания SC и DC с миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-21 и миРНК-155, соответственно. В схематичных изображениях комплексов SC и DC с миРНК (**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 миРНК 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. 20 А, В, Г, Е). Конъюгаты, направленные к миРНК-21, проявляли более низкую степень связывания с

мишенью, составляющую 85% (Рис. 20 Б, В, Д, Е). Разница в эффективности гибридизации для разных миРНК 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 комплексообразования (K_a) в двух буферных системах показало, что связывание всех исследуемых ВС с миРНК в буфере I в 6–10 раз эффективнее, чем в буфере II, 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. Например, K_a 17-BC- α и 17-BC- β в буфере I составляют $46.1 \pm 15.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $42.7 \pm 13.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, а в буфере II – $3.6 \pm 1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $4.5 \pm 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

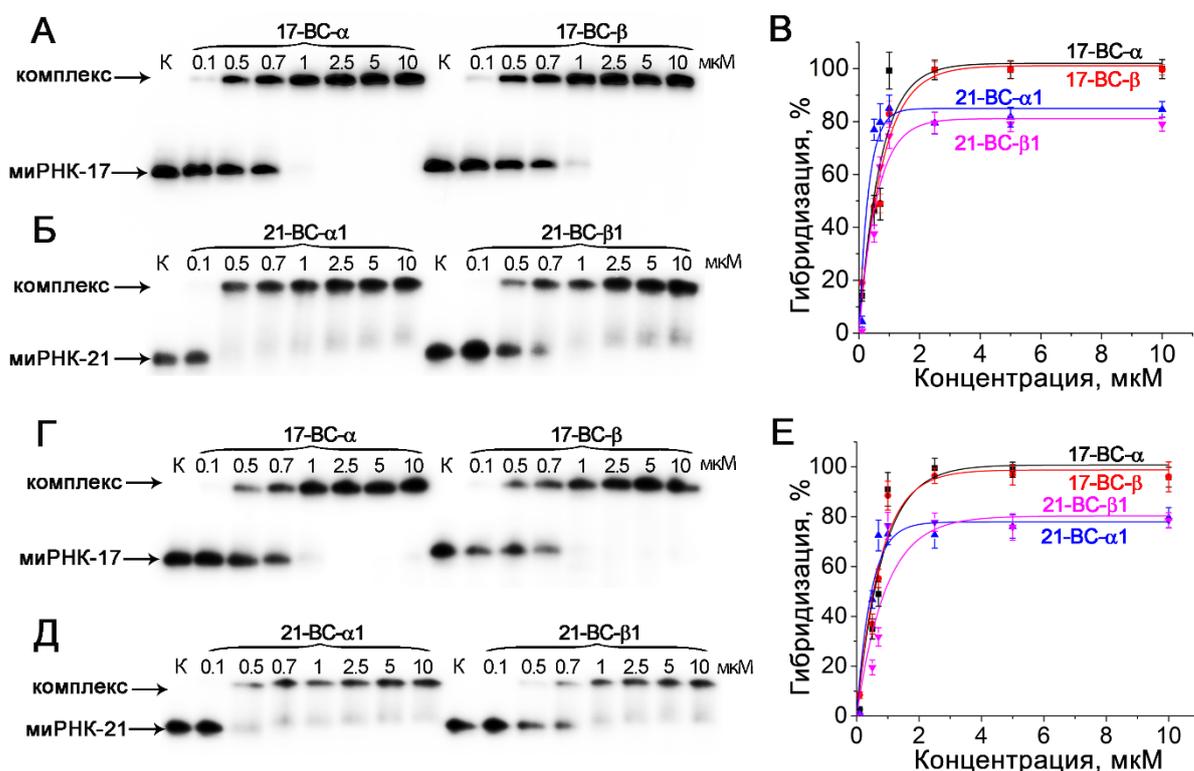


Рис. 20. Гибридизация синтетических 5'-[³²P]-миРНК с петлеобразующими миРНКазами (ВС) в двух буферных системах. А, Б, Г, Д – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации миРНКаз 17-BC- α и 17-BC- β с миРНК-17 (А, Г) и 21-BC- α 1 и 21-BC- β 1 с миРНК-21 (Б, Д) в буфере I (А, Б) и буфере II (Г, Д). МиРНК в концентрации 1 μM инкубировали с миРНКазами в концентрациях 0.1 – 10 μM в буфере I или буфере II при 37 °С в течение 45 мин. К – контроль, миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. В, Е – концентрационные зависимости связывания миРНКаз с миРНК-мишенями в буфере I (В) и буфере II (Е).

Для петлеобразующих миРНКаз, направленных к миРНК-17, ориентация пептида, α или β , не оказывала значительного влияния на эффективность гибридизации с миРНК. Значения константы комплексообразования 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. Однако, для ВС, направленных к миРНК-21, наблюдали различие в эффективности связывания в зависимости от ориентации пептида: K_a для 21-BC- α 1

составила $96.0 \pm 30.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, тогда как для 21-BC- β 1 – лишь $4.9 \pm 1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Таким образом, α -ориентация пептидного компонента в составе ВС, направленных к миРНК-21, обеспечивает более высокую аффинность к мишени по сравнению с β -конфигурацией.

3.2.3. Исследование гибридизационных свойств крабоподобных миРНКаз

Оценку связывающей способности крабоподобных миРНКаз с идентичными адресующими доменами оценивали для 21-СС- $\alpha\alpha$, направленного к миРНК-21, и 17-СС- $\alpha\alpha$, направленного к миРНК-17. Исследования показали, что в эквимольном соотношении исследуемые миРНКазы демонстрировали низкую эффективность связывания. Максимальная эффективность гибридизации достигалась при 5-кратном избытке СС по отношению к миРНК, когда степень комплексообразования составляла 84% для 21-СС- $\alpha\alpha$ и 89% для 17-СС- $\alpha\alpha$ (Рис. 21). 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 °С и 54.4 °С, соответственно, а также существовать в виде частично комплементарных гомодуплексов ($T_m=49.7$ °С для миРНК-21 и $T_m=44.4$ °С для миРНК-17) (Рис. 22). 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- $\alpha\alpha$ и $0.34 \pm 0.09 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для 17-СС- $\alpha\alpha$.

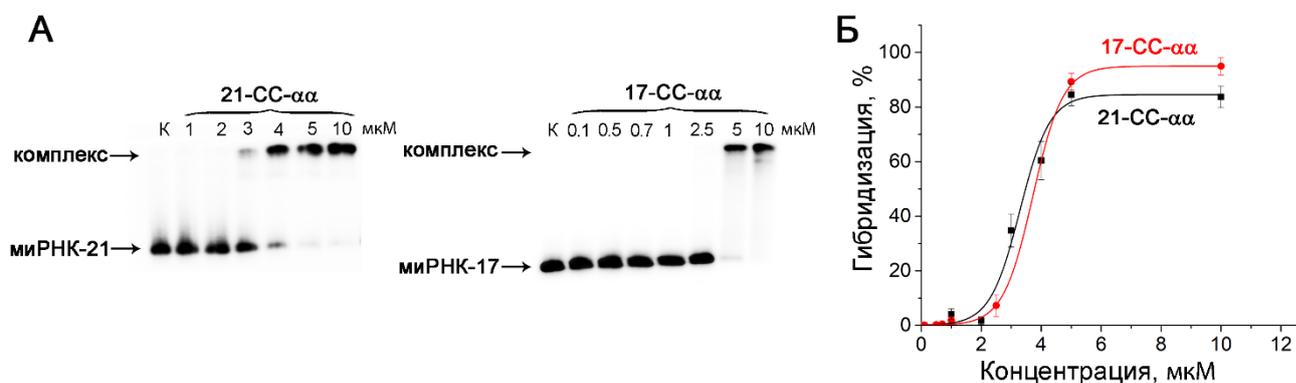


Рис. 21. Гибридизация синтетических 5'- ^{32}P -меченых миРНК-21 и миРНК-17 с крабоподобными миРНКазы (СС). **А** – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации миРНКаз 21-СС- $\alpha\alpha$ и 17-СС- $\alpha\alpha$ с миРНК-21 и миРНК-17. МиРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с миРНКазы в концентрациях 0.1 – 10 мкМ в буфере I при 37°С в течение 45 мин. К – контроль, миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. **Б** – концентрационная зависимость связывания миРНКаз с миРНК-мишенями.

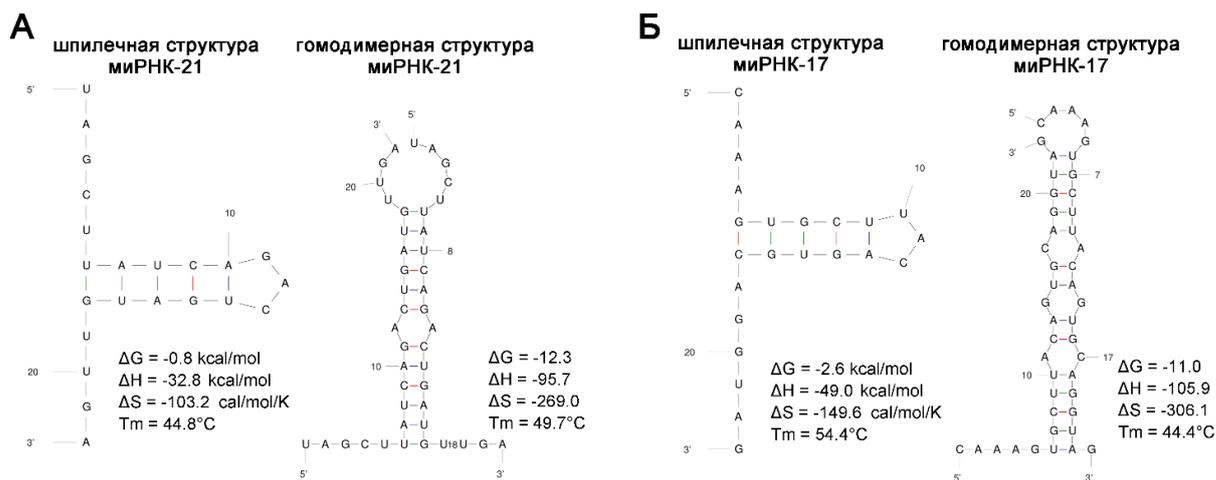


Рис. 22. Наиболее стабильные шпилечные и гомодимерные структуры миРНК-21 (А), миРНК-17 (Б) при концентрации 1 мкМ согласно сервису DINAMelt (www.unafold.org).

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 миРНК, при этом степень гибридизации составляет 65-75% (Рис. 23 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 миРНК, что наиболее отчетливо наблюдалось при низких концентрациях (0.1 – 1 мкМ) (Рис. 23 Б и В).

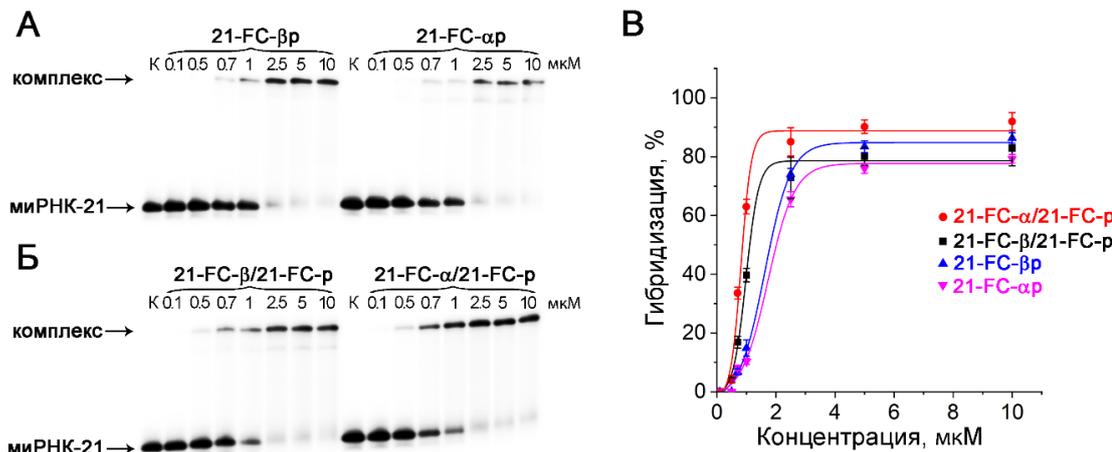


Рис. 21. Гибридизация синтетической 5'- ^{32}P -миРНК-21 с вилкоподобными миРНКазами (FC). А, Б – радиоавтографы 15%-ных нативных ПААГ, демонстрирующие степень гибридизации бис-пептидных вилкоподобных миРНКаз 21-FC- β р, 21-FC- α р (А) и моно-пептидных аналогов 21-FC- β /21-FC-р, 21-FC- α /21-FC-р (Б) с миРНК-21. МиРНК в концентрации 1 мкМ инкубировали с миРНКазами в концентрациях 0.1 – 10 мкМ в буфере I при 37 °С в течение 45 мин. К – контроль, миРНК-21 инкубировали в отсутствие миРНКаз. В – концентрационная зависимость связывания миРНКаз с миРНК-мишенью.

Константы ассоциации для бис-пептидных вилкоподобных миРНКаз ($0.57 \pm 0.07 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для 21-FC- α p и $0.63 \pm 0.09 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для 21-FC- β p) в 2–3 раза ниже по сравнению с соответствующими моно-пептидными аналогами ($2.83 \pm 0.75 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для 21-FC- α /21-FC-p и $1.58 \pm 0.21 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для 21-FC- β /21-FC-p). 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 миРНК.

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 от последовательности миРНК-мишени, в частности, GC-состава и её вторичных структур. Также, на примере петлеобразующих миРНКаз показано влияние буферной системы на эффективность связывания. В результате исследований установлено, что все разработанные миРНКазы способны образовывать комплексы с миРНК-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 миРНК, а для вилкоподобных – при 2.5-кратном избытке.

3.3. Исследование каталитической активности и нуклеотидной специфичности разработанных миРНКаз

Комплексное изучение эффективности и специфичности расщепления миРНК 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 миРНК), что соответствует оптимизированным ранее условиям анализа каталитических характеристик структурно-родственных искусственных рибонуклеаз [45,46,269] и обеспечивает возможность сравнительного анализа с ранее сконструированными соединениями, и (2) многооборотный каталитический режим (с 2-кратным избытком миРНК), необходимый для оценки способности расщеплять избыток молекул-мишеней, что моделирует биологические условия. Реакцию расщепления в условиях однооборотной реакции проводили при концентрации миРНК 1 мкМ и миРНКаз 5 мкМ или 20 мкМ. Реакцию расщепления в условиях многооборотной реакции проводили при концентрации миРНК 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». Сводные результаты оценки рибонуклеазной активности миРНКаз приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Рибонуклеазная активность разработанных миРНКаз.

миРНКаз	$k_{obs}, \times 10^{-6}, c^{-1}$	$t_{1/2}, ч$	Сайты расщепления
Двойные миРНКазы (DC)			
17-DC	0.17±0.02 ^(1, I) 0.78±0.18 ^(1, II)	1137.56±71.16 ^(1, I) 254.29±33.25 ^(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	0.36±0.02 ^(1, I) 1.77±0.12 ^(1, II)	540.62±18.12 ^(1, I) 109.32±4.20 ^(1, II)	U12-A13 ^(1, I) U15-G16, G14-U15, A13-G14, U12-A13, C11-U12, U10-C11 ^(1, II)
21-DC	0 ^(1, I) 2.01±0.35 ^(1, II)	0 ^(1, I) 97.99±9.81 ^(1, II)	U14-G15, C13-U14, A12-C13, G11-A12, A10-G11, C9-A10 ^(1, II)
155-DC	0.79±0.29 ^(1, I) 13.14±3.70 ^(1, II)	269.46±59.94 ^(1, I) 15.49±2.56 ^(1, II)	U17-A18, G15-A16, U14-G15, G13-U14, U12-G13, U11-U12, U8-A9 ^(1, I) U17-A18, A16-U17, G15-A16, U14-G15, C13-U14, U12-G13, U11-U12, U8-A9 ^(1, II)
Петлеобразующие миРНКазы (BC)			
21-BC-α1	0 ^(1, I) 0.38±0.03 ^(1, II)	0 ^(1, I) 512.59±21.97 ^(1, II)	A10-G11, C9-A10, U8-C9 ^(1, II)
21-BC-α2	0 ^(1, I) 0.28±0.01 ^(1, II)	0 ^(1, I) 695.64±15.05 ^(1, II)	G11-A12, A10-G11, C9-A10 ^(1, II)
21-BC-β1	0 ^(1, I) 0.87±0.05 ^(1, II)	0 ^(1, I) 221.97±6.98 ^(1, II)	G11-A12, A10-G11, C9-A10, U8-C9 ^(1, II)
21-BC-β2	0 ^(1, I) 0.57±0.03 ^(1, II)	0 ^(1, I) 337.43±10.35 ^(1, II)	G11-A12, A10-G11, C9-A10, U8-C9 ^(1, II)
17-BC-α	1.31±0.08 ^(1, I) 1.48±0.12 ^(1, II)	147.90±5.23 ^(1, I) 130.25±5.89 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, I) C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
17-BC-β	1.13±0.06 ^(1, I) 1.19±0.03 ^(1, II)	170.22±5.46 ^(1, I) 161.97±2.58 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, I) C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
17-BC-αα	4.86±0.27 ^(1, II)	39.65±1.05 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
17-BC-ββ	13.9±3.26 ^(1, II)	14.41±1.97 ^(1, II)	C12-A13, A11-C12, U10-A11 ^(1, II)
Крабоподобные миРНКазы (CC)			
21-CC-αα	4.50±0.56 ⁽²⁾ 2.56±0.10 ⁽³⁾	44.14±5.26 ⁽²⁾ 75.36±1.65 ⁽³⁾	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾ C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽³⁾
21-CC-ββ	6.07±0.29 ⁽²⁾ 4.64±0.12 ⁽³⁾	31.90±1.58 ⁽²⁾ 41.52±0.58 ⁽³⁾	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⁾
21-CC-pp	20.08±1.73 ⁽²⁾ 22.34±2.92 ⁽³⁾	9.59±0.51 ⁽²⁾ 8.72±0.65 ⁽³⁾	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⁾
21-CC-5'p	0.61±0.05 ⁽²⁾	317.02±13.60 ⁽²⁾	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾
21-CC-3'p	1.91±0.02 ⁽²⁾	100.58±0.57 ⁽²⁾	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾

21-CC-5'α/21-CC-3'α	0.67±0.04 ⁽²⁾	286.39±10.65 ⁽²⁾	C9-A10, U6-A7, C4-U5, U1-A2 ⁽²⁾
17-CC-αα	88.55±4.43 ⁽²⁾ 49.08±7.01 ⁽³⁾	2.18±0.11 ⁽²⁾ 3.98±0.32 ⁽³⁾	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⁾
17-CC-5'α/17-CC-3'α	3.17±0.36 ⁽²⁾	61.17±3.90 ⁽²⁾	U21-A22, C12-A13, U10-A11, U6-G7, C1-A2 ⁽²⁾
Вилкоподобные миРНКазы (FC)			
21-FC-αр	8.5±1.3 ^(1, I) 14.6±3.3 ⁽³⁾	21.73±1.97 ^(1, I) 12.55±1.64 ⁽³⁾	U1-A2, U14-G15, U17-G18, U19-U20 ^(1, I) U1-A2, U6-A7, C9-A10, U17-G18 ⁽³⁾
21-FC-βр	4.6±0.3 ^(1, I) 5.0±0.3 ⁽³⁾	41.37±1.14 ^(1, I) 38.11±1.16 ⁽³⁾	U1-A2, U14-G15, G15-A16, U17-G18, G18-U19, U19-U20, G21-A22 ^(1, I) U1-A2, U6-A7, C9-A10 ⁽³⁾
21-FC-α/21-FC-р	7.9±0.7 ^(1, I)	23.72±1.18 ^(1, I)	U1-A2, U14-G15, U17-G18, U19-U20 ^(1, I)
21-FC-β/21-FC-р	5.2±0.5 ^(1, I)	36.56±1.57 ^(1, I)	U1-A2, U14-G15, U17-G18, U19-U20 ^(1, I)

k_{obs} – наблюдаемая константа скорости гидролиза РНК-мишени. $t_{1/2}$ – время полурасщепления миРНК. ^(1, I) и ^(1, II) однооборотный режим реакции с 20-кратным избытком миРНКазы по отношению к миРНК ([миРНК] = 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 миРНК ([миРНК] = 1 мкМ и [миРНКазы] = 5 мкМ) в буфере I; ⁽³⁾ многооборотный режим реакции ([миРНК] = 10 мкМ и [миРНКазы] = 5 мкМ) в буфере I. Сайты расщепления обозначены цветами в соответствии с функциональной областью миРНК: **розовый** – затравочная область; **голубой** – центральная петля; **оранжевый** – область 3'-дополнительных взаимодействий; **фиолетовый** – 3'-терминальная область. 0 – при инкубации миРНКазы и миРНК в течение 72 ч расщепление миРНК не обнаружено.

3.3.1. Исследование рибонуклеазной активности двойных миРНКаз

Исследование эффективности и специфичности расщепления миРНК под действием двойных миРНКаз 17-DC, 18а-DC, 21-DC, 155-DC (Таблица 3) проводили в условиях однооборотной реакции с 20-кратным избытком конъюгата по отношению к миРНК в двух буферных системах.

Нами обнаружено, что состав буферного раствора оказывает существенное влияние на эффективность и специфичность расщепления миРНК-мишеней двойными миРНКазами. Кинетический анализ расщепления миРНК-17, миРНК-18а и миРНК-155 под действием DC показал, что степень расщепления мишеней в буфере I через 48 ч составляет 2%, 7% и 16%, соответственно (Рис. 24). Изучение паттернов расщепления миРНК 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. 24 А), для миРНК-18а – U12-A13 (Рис. 24 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. 24 В). Такой паттерн расщепления объясняется присутствием лабильных пар оснований U-A в областях, прилегающих к одноцепочечному гэпу, что способствует локальной конформационной флуктуации («дыханию») дуплекса DC с миРНК.

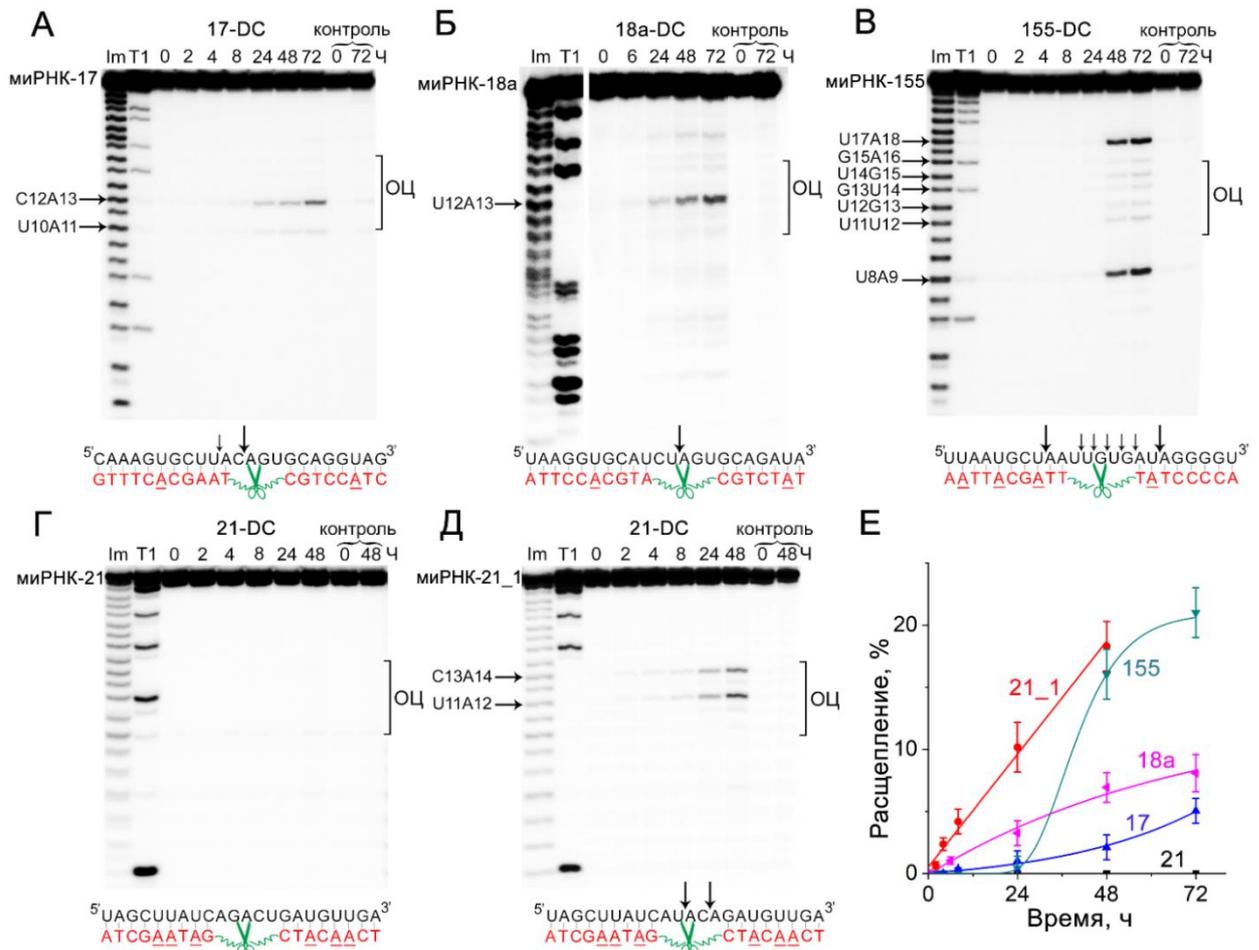


Рис. 24. Кинетика расщепления синтетических 5'-[³²P]-меченых миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1 двойными миРНКазами в буфере I. А – Д – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1, соответственно. миРНК (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]-миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК с миРНКазами (в часах). ОЦ – одноцепочечный участок, образующийся при связывании DC с миРНК-мишенью. Е – кинетические зависимости расщепления миРНК под действием двойных миРНКаз. A – 2-аминоаденин.

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. 24 Г) – отсутствием чувствительных к данному типу конъюгатов пиримидин-А связей в области одноцепочечного участка миРНК, образуемого при связывании с DC. Для проверки данной гипотезы был проведен анализ расщепления синтетической миРНК-21_1, содержащей 2 замены в области одноцепочечного участка миРНК (AGACU → AUACA) с целью получения более чувствительных к расщеплению С-А и U-А связей. Было выявлено, что замены,

действительно, обеспечивают расщепление миРНК-21_1 миРНКазой 21-DC по сайтам U11-A12 и C13-A14, а степень расщепления достигает 18% (Рис. 24 Д и Е).

При проведении реакции расщепления миРНК 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. 25 А – В, Е). В этих условиях эффективность расщепления мишени под действием 21-DC увеличилась с 0 до 30% для миРНК-21 и с 18 до 63% для миРНК-21_1 (Рис. 25 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 6). Изучение профиля расщепления миРНК показало, что двойные миРНКазы расщепляли мишень практически по всем сайтам в одноцепочечном участке миРНК, образуемом при связывании с DC, с преобладанием расщепления по U-A и C-A связям.

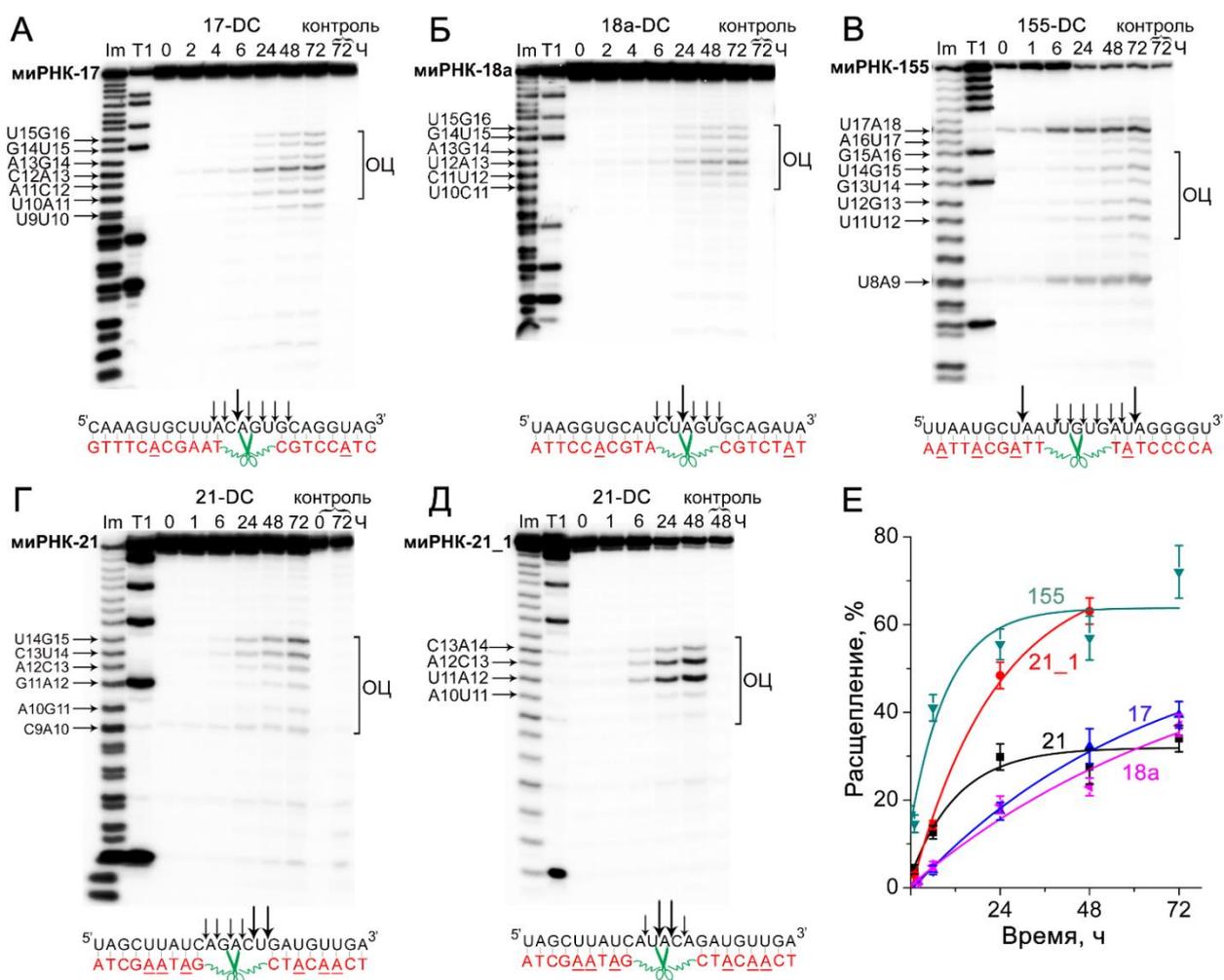


Рис. 25. Кинетика расщепления синтетических 5'-[³²P]-меченых миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1 двойными миРНКазами в буфере II. А – Д – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17, миРНК-18а, миРНК-155, миРНК-21 и миРНК-21_1, соответственно. миРНК (1 мкМ) и миРНКазу (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]-миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК с миРНКазами (в часах). ОЦ – одноцепочечный участок, образующийся при связывании ДС с миРНК-мишенью. Е – кинетические зависимости расщепления миРНК под действием двойных миРНКаз. А – 2-аминоаденин.

Для определения условий, в которых миРНКазы способны эффективно и специфично катализировать расщепление миРНК, представляло интерес исследование рибонуклеазной активности соединений в буферных системах с различным диапазоном значений рН.

Для исследования влияния рН на каталитическую активность двойных миРНКаз была проведена серия экспериментов по расщеплению миРНК-17 и миРНК-18а соответствующими ДС в буферных растворах с перекрывающимися значениями рН: натрий-ацетатном буфере (SA) с рН 3.7–5.0, 2-(N-морфолино)этансульфонатном буфере (MES) с рН 4.5–6.0, 1,3-бис[трис(гидроксиметил)метиламино]пропановом буфере (BTP) с рН 6.0–9.5 и трис(гидроксиметил)аминометановом буфере (Трис-НСl) с рН 7.0–9.0 (подробнее см. раздел «Материалы и методы» 2.2.6). 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 миРНК инкубировали в тех же буферах и условиях, но без добавления конъюгатов (Рис. 26).

Нами обнаружено, что рН-зависимые профили расщепления миРНК двойными миРНКазами можно чётко разделить на три области (Рис. 27). В кислой среде (рН 3.7–5.0) наблюдалось неспецифическое расщепление по всей длине молекулы миРНК, что, вероятно, связано с дестабилизацией дуплекса миРНК/ДС в условиях низкого рН (Рис. 27 А). Этот эффект наиболее отчетливо виден на примере 17-ДС при молярном соотношении миРНК/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 рН 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 рН (5.5 – 8.0) преобладало специфическое расщепление в одноцепочечной области миРНК, достигая максимума при рН 7.0 для 17-ДС (сайты U10-A11 и C12-A13) и рН 5.5 для 18а-ДС (сайты U12-A13, A13-G14 и G14-U15) (Рис. 27). В щелочной среде (рН 8.5–9.5) наблюдался неспецифический щелочной гидролиз миРНК. В этих условиях расщепление в контрольных условиях в отсутствие ДС происходило по всей длине молекулы, а при добавлении ДС деградация происходила по всем связям в одноцепочечной области комплекса, не защищенной связыванием олигонуклеотидными «плечами» конъюгатов (Рис. 26, Рис. 27).

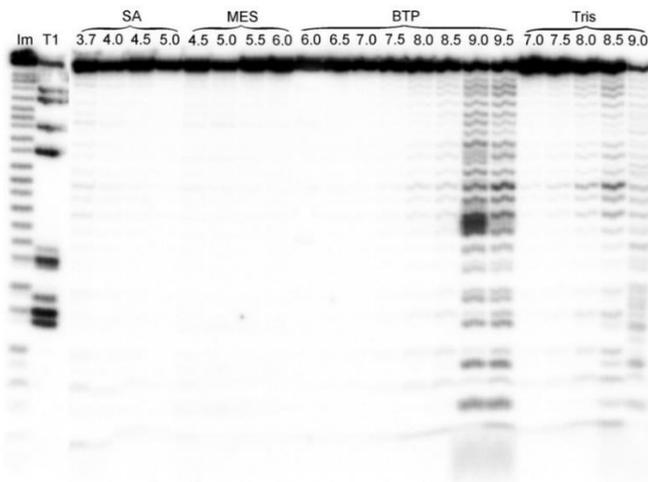


Рис. 26. Самопроизвольный гидролиз 5'-[³²P]-меченой миРНК-17 при различных рН. Радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующий продукты расщепления миРНК-17. миРНК-17 в концентрации 1 мкМ инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Над дорожками обозначены значения рН буферного раствора. SA – натрий-ацетатный буфер; MES – 2-(N-морфолино)этансульфонатный буфер; BTP – бис[трис(гидроксиметил)метиламино]пропановый буфер; Tris – трис(гидроксиметил)аминометановый буфер.

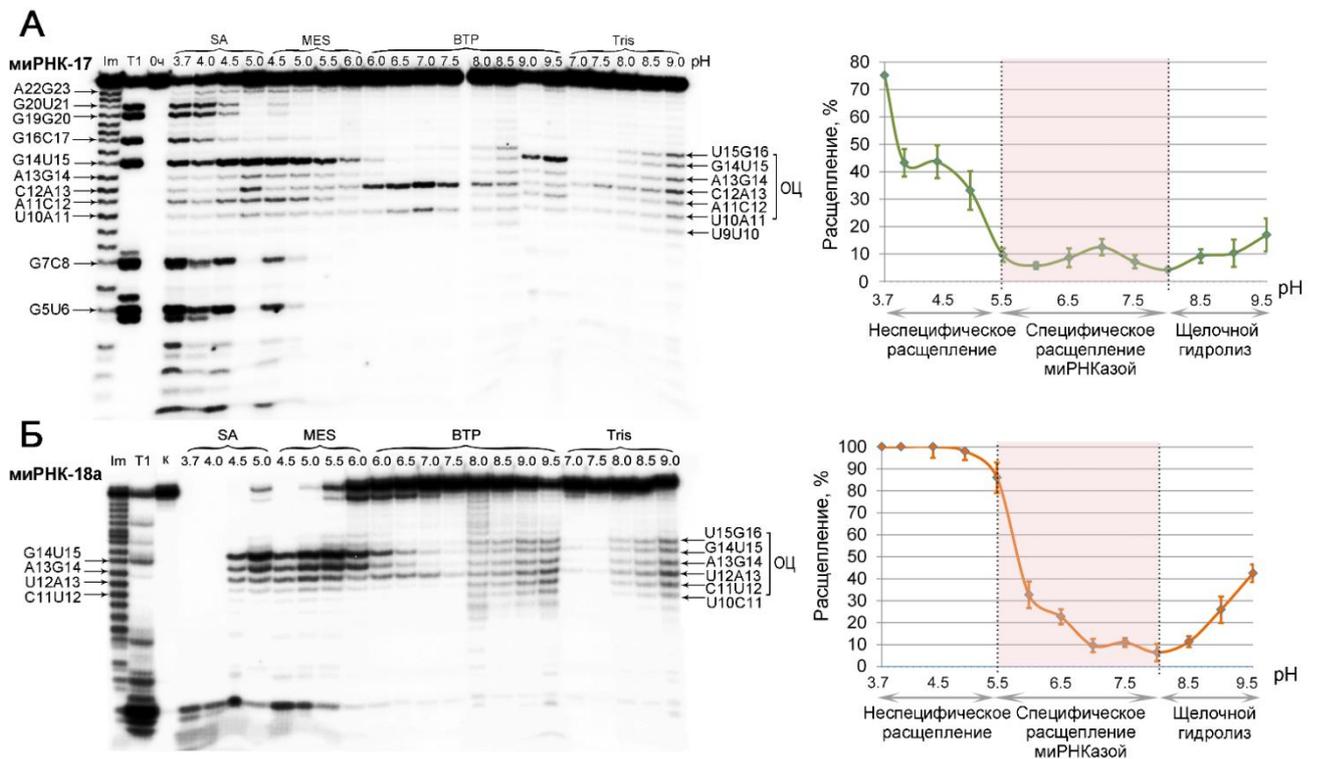


Рис. 27. рН-зависимые профили расщепления синтетических 5'-[³²P]-меченых миРНК-17 и миРНК-18а двойными миРНКазами. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 (**А**) и миРНК-18а (**Б**). миРНК-17 (1 мкМ) и 17-ДС (10 мкМ) или миРНК-18а (1 мкМ) и 18а-ДС (20 мкМ) инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. К – 5'-[³²P]-миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз в буфере с Tris-HCl (рН 7.0). Над дорожками обозначены значения рН буферного раствора. Розовая область на диаграммах обозначает диапазон рН, при котором наблюдалось специфическое расщепление миРНК под действием ДС. ОЦ – одноцепочечный участок, образующийся при связывании ДС с миРНК-мишенью. SA – натрий-

ацетатный буфер; MES – 2-(N-морфолино)этансульфонатный буфер; ВТР – бис[трис-(гидроксиметил)метиламино]пропановый буфер; Tris – трис(гидроксиметил)аминометановый буфер.

Таким образом, анализ влияния pH на рибонуклеазную активность двойных миРНКаз показал, что эффективное и сиквенс-специфическое расщепление миРНК двойными миРНКазами происходит при субкислых и нейтральных значениях pH. Известно, что внеклеточная среда злокачественных новообразований, особенно в гипоксических и аноксических областях опухолевых тканей, характеризуется субкислыми значениями pH в диапазоне от 5.4 до 6.8 в зависимости от типа опухоли, тогда как в нормальных тканях pH составляет 7.0–7.6 [314,315]. Это обусловлено высоким уровнем образования молочной кислоты и активностью Na^+/K^+ -АТФаз и протонных насосов [316]. Анализ pH-профиля активности DC показывает, что конъюгаты потенциально способны селективно разрушать миРНК в кислой среде опухоли с минимальным воздействием на нормальные ткани.

3.3.2. Исследование рибонуклеазной активности петлеобразующих миРНКаз

Сайт-направленное расщепление 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 миРНК-направленных петлеобразующих рибонуклеаз на первом этапе исследования была проведена оценка способности к спонтанному гидролизу фосфодиэфирных связей в области тринуклеотидного выпетливания вследствие внутримолекулярного напряжения, индуцируемого в результате гибридизации с петлеобразующим олигонуклеотидом, неконъюгированным с пептидом (Рис. 28). В этих экспериментах 5'-[^{32}P]-миРНК инкубировали с адресующими олигонуклеотидами В-ОН в буфере I и 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 миРНК 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. 28). 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 [317]. Таким образом, увеличение реакционной способности

фосфодиэфирных связей в последовательности миРНК 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 миРНК.

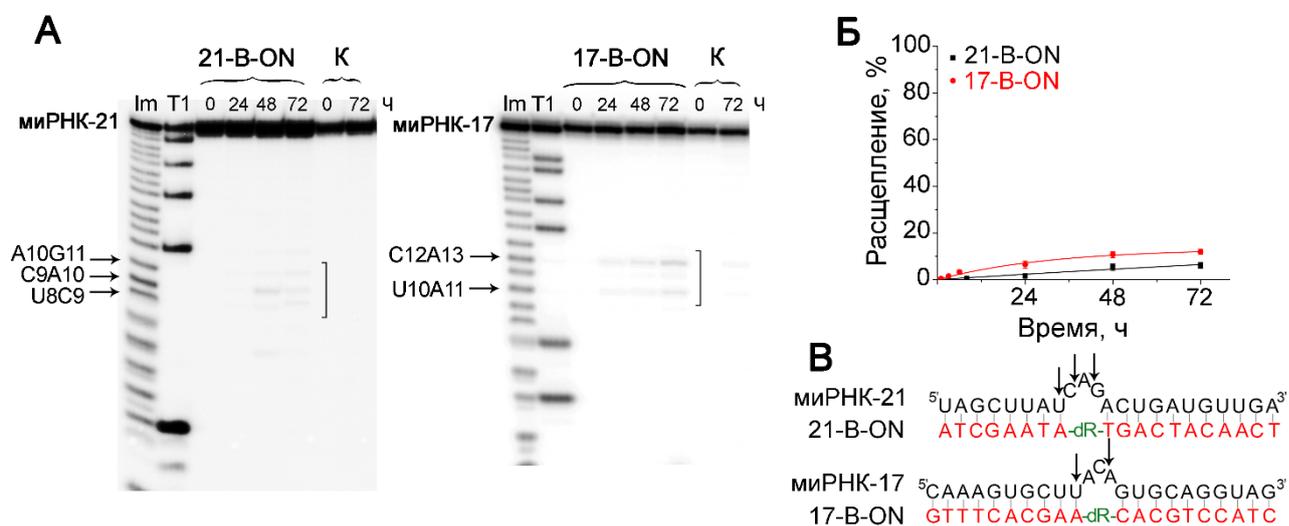


Рис. 28. Расщепление синтетических 5'-[³²P]-меченых миРНК-21 и миРНК-17 в комплексе с петлеобразующими олигонуклеотидами 21-B-ON и 17-B-ON в присутствии ионов Mg²⁺ (буфер II). **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 и миРНК-17. МиРНК (1 мкМ) и 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'-[³²P]-миРНК инкубировали в отсутствие олигонуклеотида. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК 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. **Б'** – 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 избытке рибонуклеаз по отношению к 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 расщепляют мишень в области петли, приводя к 25–30 %-ной деградации миРНК через 72 ч (Таблица 6, Рис. 29 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 6,

Рис. 29 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. 29 А и В).

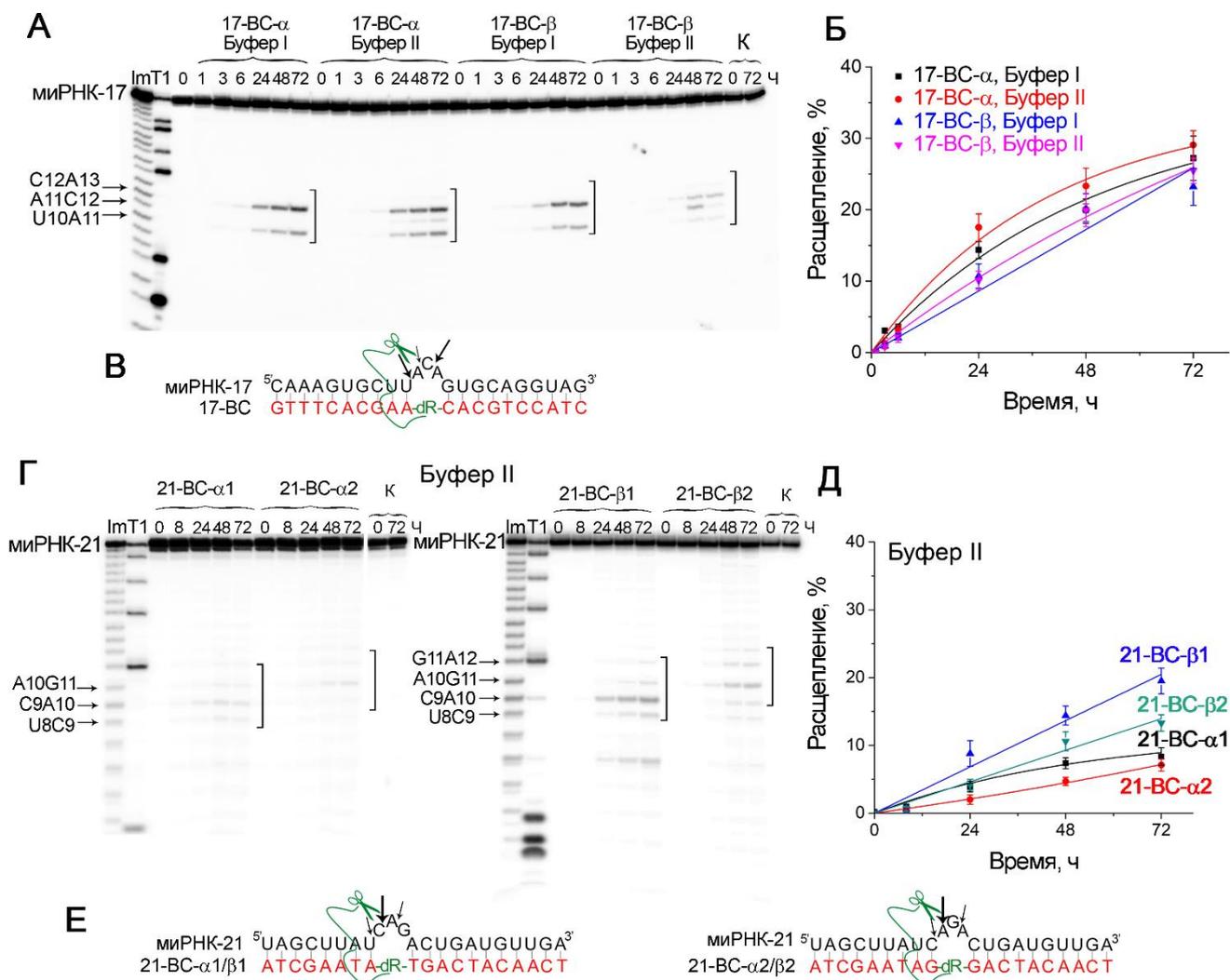


Рис. 29. Расщепление 5'-[³²P]-миРНК-17 и 5'-[³²P]-миРНК-21 моно-пептидными петлеобразующими миРНКазми 17-BC-α, 17-BC-β, 21-BC-α1, 21-BC-α2, 21-BC-β1 и 21-BC-β2. **А, Г** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 в буфере I и II (**А**) и миРНК-21 в буфере II (**Г**). МиРНК (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'-[³²P]-миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК с миРНКазми (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-BC-α/β и миРНК-21 под действием 21-BC-α1/β1 и 21-BC-α2/β2. Размер стрелок соответствует степени расщепления миРНК в конкретных сайтах.

Исследование рибонуклеазной активности миРНК-21-направленных моно-пептидных петлеобразующих миРНКаз показало, что 21-BC-α1, 21-BC-β1, 21-BC-α2 и 21-BC-β2 не способны катализировать расщепление миРНК в буфере I, тогда как в буфере II рибонуклеазная активность

ВС заметно возрастала (Рис. 29 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- β 1 и 21-ВС- β 2 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- α 1 и 21-ВС- α 2, была приблизительно вдвое ниже и составляла 7-8%, что лишь незначительно превышало гидролиз миРНК в комплексе с неконъюгированным олигонуклеотидом 21-В-ОН (Рис. 28 Б, Рис. 29 Д). Значения k_{obs} для 21-ВС- β 1 и 21-ВС- β 2 более чем в два раза превышали значения для α -изомеров 21-ВС- α 1 и 21-ВС- α 2 (Таблица 6). Анализ паттерна расщепления миРНК-21 петлеобразующими миРНКазми показал, что все три фосфодиэфирные связи в тринуклеотидной петле подвергаются гидролизу, однако интенсивность расщепления по отдельным связям различались для пар 21-ВС- α 1/ β 1 и 21-ВС- α 2/ β 2 вследствие смещения одноцепочечной области (Рис. 29 Г и Е). Эффективность соединений 21-ВС- α 1/ β 1, расщепляющих миРНК преимущественно по связи С9-А10, была выше, чем у 21-ВС- α 2/ β 2, для которых основным сайтом расщепления являлся А10-Г11. Данное различие обусловлено повышенной восприимчивостью С-А связи к гидролизу как природными, так и искусственными рибонуклеазами, а также склонностью к спонтанному расщеплению, как было показано ранее [317].

Исследование каталитических свойств бис-пептидных петлеобразующих миРНКаз проводили в буфере II, обеспечивающем наиболее выраженную деградацию миРНК под действием этого типа конъюгатов. Сравнительный анализ показал, что рибонуклеазная активность бис-пептидных миРНКаз 17-ВС- $\alpha\alpha$ и 17-ВС- $\beta\beta$ (Рис. 30) значительно превосходит активность моно-пептидных аналогов 17-ВС- α и 17-ВС- β (Рис. 29). 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. 30 Б). 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. 30 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 миРНК k_{obs} миРНКазми 17-ВС- $\alpha\alpha$ и 17-ВС- $\beta\beta$ в 2 и 3 раза превышали значения для моно-пептидных вариантов ВС (Таблица 6). Полученные результаты согласуются с ранее проведёнными исследованиями по расщеплению тРНК^{Phe}, в которых петлеобразующие $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -рибонуклеазы обеспечивали 90%-ное расщепление РНК в области петли за 48 ч инкубации [286]. Анализ паттерна расщепления мишени бис-пептидными конъюгатами показал, что, как и в случае моно-пептидных рибонуклеаз, первичными сайтами

расщепления миРНК-17 под действием 17-BC- $\alpha\alpha$ и 17-BC- $\beta\beta$ являются связи C12-A13 и U10-A11 (Рис. 30 А и В).

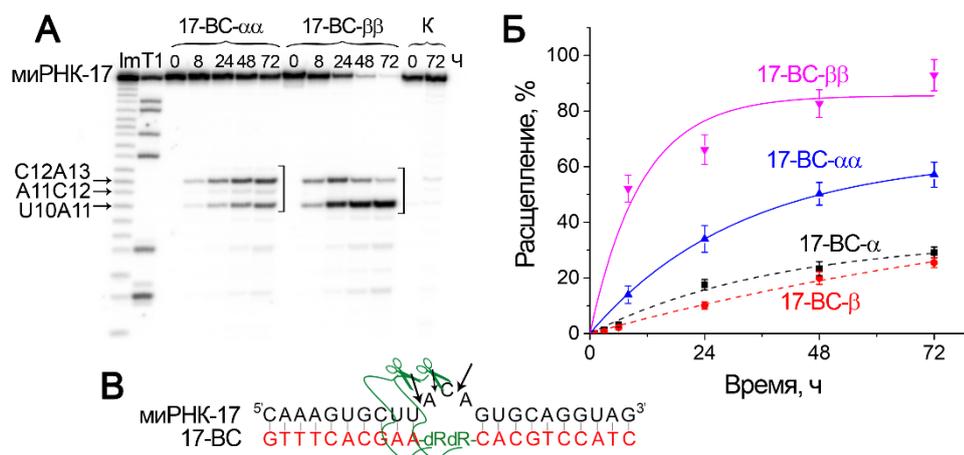


Рис. 30. Расщепление 5'-[32 P]-миРНК-17 бис-пептидными петлеобразующими миРНКазы 17-BC- $\alpha\alpha$ и 17-BC- $\beta\beta$. **А** – радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующего продукты расщепления миРНК-17. МиРНК (1 мкМ) и миРНКазы (20 мкМ) инкубировали в буфере II при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[32 P]-миРНК-17 инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК 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 миРНКазы (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 миРНК (1 мкМ) – условиях, при которых достигалось максимальное связывание СС с миРНК-мишенью (Рис. 21).

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. 31 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- $\beta\beta$ и 32% для 21-СС- $\alpha\alpha$. 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- $\beta\beta$ ($t_{1/2} = 31.9 \pm 1.6$ ч) и 21-СС- $\alpha\alpha$ ($t_{1/2} = 44.1 \pm 5.3$ ч) (Рис. 31 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.

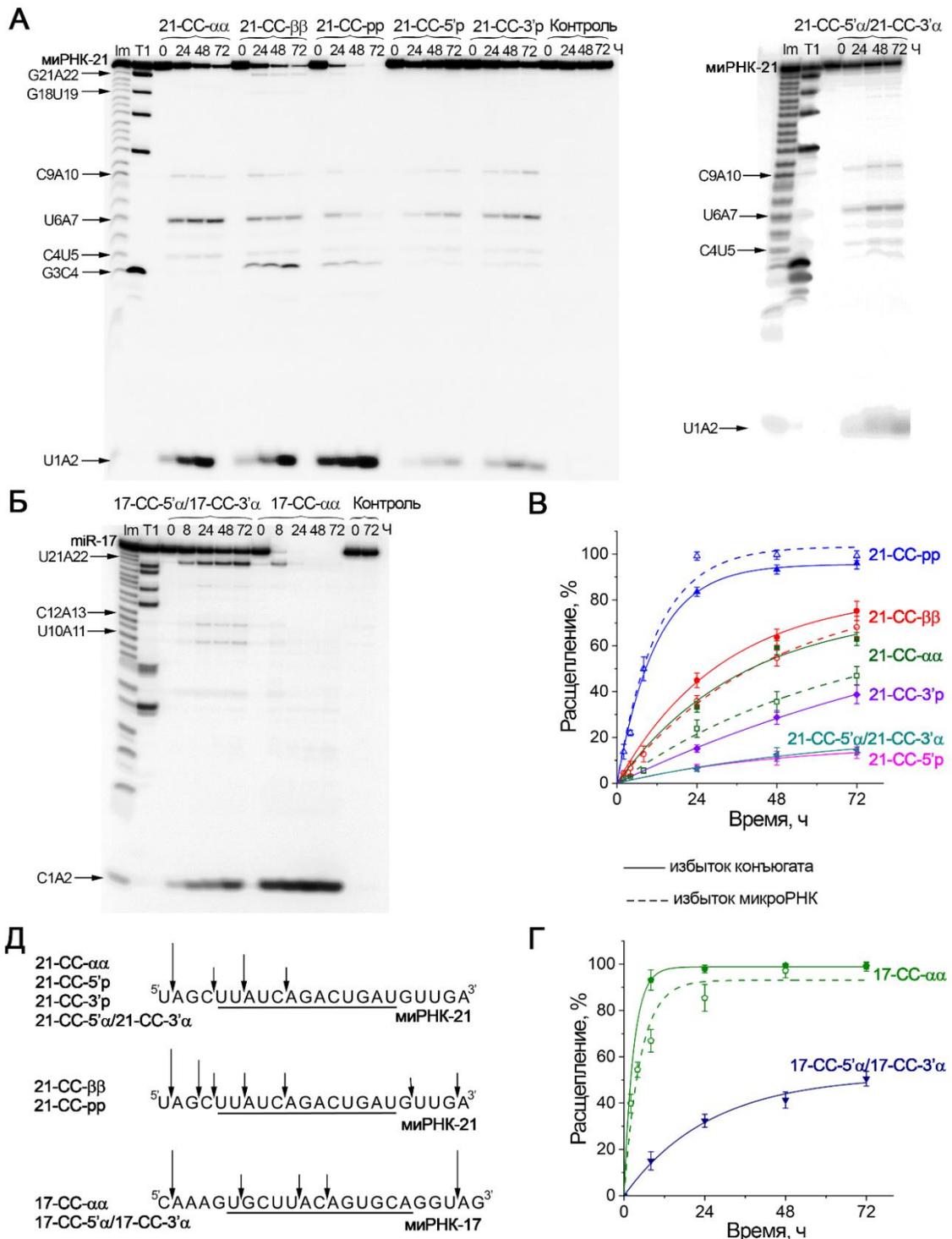


Рис. 31. Расщепление 5'-[32 P]-меченых миРНК-21 и миРНК-17 крабоподобными миРНКазами в условиях однооборотной реакции. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 и миРНК-17 миРНКазами 21-CC- $\alpha\alpha$, 21-CC- $\beta\beta$, 21-CC-pp, 21-CC-5'p, 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**). МиРНК (1 мкМ) и миРНКазу (5 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °C в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'-[32 P]-

миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК 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 миРНК крабоподобными миРНКазами в условиях однооборотной реакции (показаны стрелками). Подчеркнутая последовательность соответствует области миРНК, находящейся в дуплексе с комплементарной миРНКазой.

Дальнейший анализ показал, что бис-пептидные крабоподобные миРНКазы значительно превосходят по каталитической активности моно-пептидные аналоги (Рис. 31 А и В). Через 24 ч инкубации степень расщепления миРНК-21 под действием моно-пептидных рибонуклеаз 21-СС-3'р и 21-СС-5'р 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. 31 В). Сходная корреляция наблюдалась для 21-СС-aa и образца 21-СС-5'α/21-СС-3'α, который является побочным продуктом синтеза 21-СС-aa и содержит смесь рибонуклеаз с одним пептидом, статистически равновероятно присоединенным либо к 3'-, либо к 5'-концу адресующего домена (Рис. 14 Ж, Таблица 3). 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-aa (Рис 31 В, Таблица 6). 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 как минимум в 10 раз для 21-СС-3'р ($t_{1/2} = 100.6 \pm 0.6$ ч) и в 33 раза для 21-СС-5'р ($t_{1/2} = 317.0 \pm 13.6$ ч) (Рис. 31 А и В, Таблица 6). Таким образом, введение двух пептидов обеспечивает синергическое усиление каталитической активности.

Аналогичные закономерности были выявлены для крабоподобных миРНКаз, направленных к миРНК-17. Бис-пептидная миРНКазы 17-СС-aa проявляла высокую каталитическую активность, приводя к 98%-ному расщеплению миРНК-17 уже через 24 ч инкубации (Рис. 31 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 при этом увеличивалось в 30 раз: с 2.2 ± 0.1 ч для 17-СС-aa до 61.2 ± 3.9 ч для смеси моно-пептидных аналогов 17-СС-5'α/17-СС-3'α (Рис. 31 Б и Г, Таблица 6).

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-aa способны расщеплять множественные копии миРНК с высокой эффективностью, сопоставимой с активностью в условиях однооборотной реакции (Рис. 31 В и Г, Рис. 32 А и Б). 21-СС-pp обеспечивал 100%-ную деградацию миРНК-21

расщепление по сайту G3-C4 на 5'-конце и G21-A22 на 3'-конце миРНК (Рис. 31 Д, Рис. 32 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-СС-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 миРНК. Также наблюдали слабое расщепление в центральном районе дуплекса по связям U10-A11 и C12-A13 (Рис. 31 Д, Рис. 32 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 миРНК под действием крабоподобных миРНКаз может служить ключевым фактором, определяющим эффективность ингибирующего действия. Так, 21-СС-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 миРНКазми. При этом расщепление других, отличных от пиримидин-А, связей также возможно, но происходит медленнее. Следует отметить, что быстрое накопление продуктов гидролиза 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-СС-pp. Данный конъюгат превосходит по каталитической активности ранее описанные высокоэффективные миРНК-21-направленные конъюгаты, включая шпилечную миРНКазу [45]. Так, 21-СС-pp обеспечивает полную деградацию мишени за 24 ч, тогда как шпилечная миРНКазы требовала для достижения аналогичного результата 48 ч [45]. Предположительно, повышенная эффективность 21-СС-pp обусловлена способностью к одновременному расщеплению в 5'- и 3'-областях миРНК-мишени, что обеспечивает образование коротких фрагментов, эффективно высвобождающихся из комплекса в процессе замещения интактной миРНК.

3.3.3. Исследование рибонуклеазной активности вилокподобных миРНКаз

Исследование рибонуклеазной активности вилокподобных миРНКаз в условиях однооборотной реакции проводили в буфере I при 20-кратном избытке соединений по отношению к миРНК. Было показано, что активность бис-пептидных FC сопоставима с моно-

пептидными аналогами 21-FC- α /21-FC- ρ и 21-FC- β /21-FC- ρ , 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- ρ и 21-FC- $\alpha\rho$ составило 23.7 ± 1.2 ч и 21.7 ± 2.0 ч, соответственно, а для 21-FC- β /21-FC- ρ и 21-FC- $\beta\rho$ – 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- ρ и 21-FC- $\alpha\rho$ и 38% для 21-FC- β /21-FC- ρ и 21-FC- $\beta\rho$ через 24 ч инкубации (Рис. 33 А и Б).

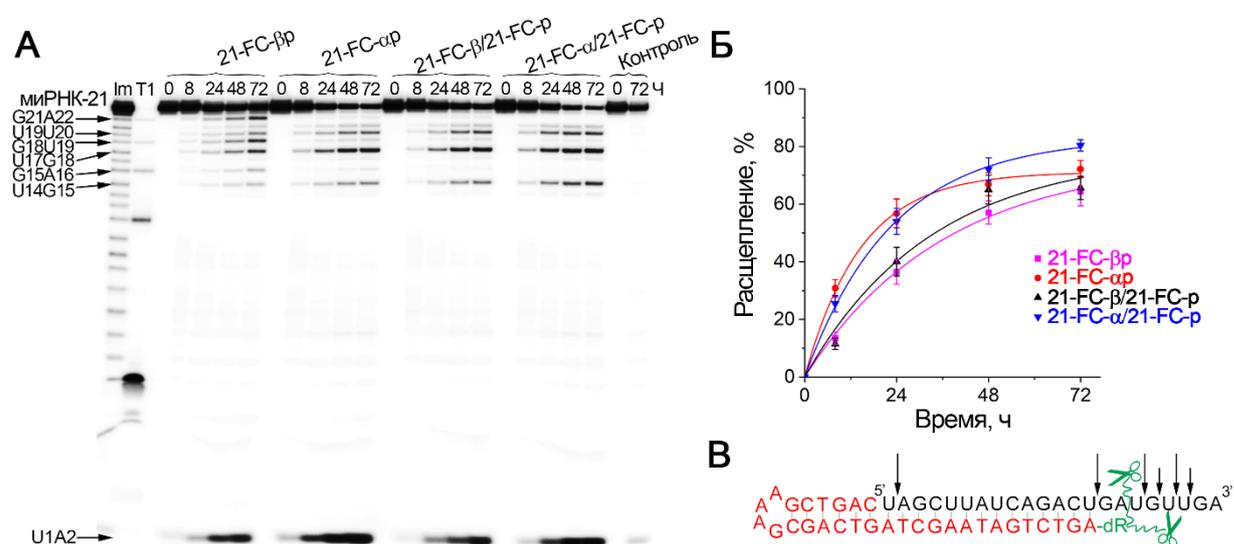


Рис. 33. Расщепление 5'-[32 P]-меченой миРНК-21 вилкоподобными миРНКазами в условиях однооборотной реакции. **А** – радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующий продукты расщепления миРНК-21 миРНКазами 21-FC- $\beta\rho$, 21-FC- $\alpha\rho$, 21-FC- β /21-FC- ρ и 21-FC- α /21-FC- ρ . МиРНК (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'-[32 P]-миРНК инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК с конъюгатом (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК-21 под действием вилкоподобных миРНКаз. **В** – сайты расщепления миРНК-21 вилкоподобными миРНКазами (показаны стрелками).

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 расширился, что было

особенно выражено для 21-FC-βр, для которого наблюдался гидролиз практически по всем фосфодиэфирным связям в 3'-концевой одноцепочечной области миРНК (Рис. 33 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-αр демонстрировал более высокую эффективность деградации миРНК по сравнению с 21-FC-βр, когда степень расщепления миРНК-21 составила 70% и 37%, соответственно, через 24 ч. К 72 ч эффективность расщепления выравнивалась, достигая 79% для 21-FC-αр ($t_{1/2}=12.5\pm 1.6$ ч) и 67% для 21-FC-βр ($t_{1/2}=38.1\pm 1.2$ ч) (Рис. 34 А и Б; Таблица 6). В условиях избытка РНК-мишени расщепление происходило в области гетеродуплекса по наиболее чувствительным фосфодиэфирным связям U1-A2, U6-A7 и C9-A10, а также слабое расщепление было отмечено в одноцепочечной 3'-области миРНК-21 по связи U17-G18 (Рис. 34 В).

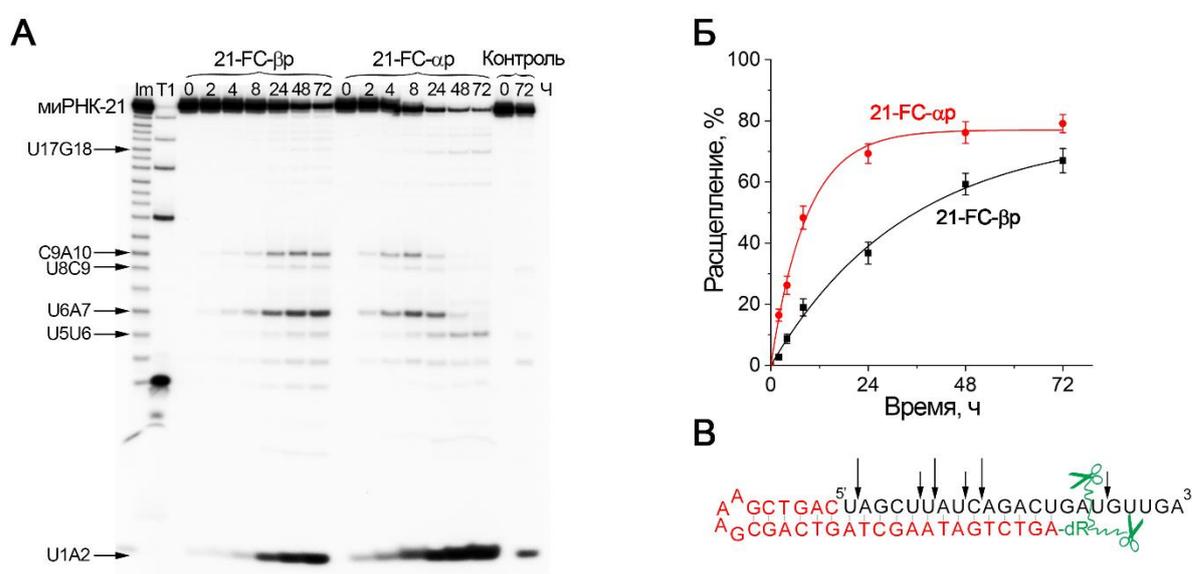


Рис. 34. Расщепление 5'- $[^{32}\text{P}]$ -меченой миРНК-21 вилкоподобными миРНКазми в условиях многооборотной реакции. **А** – радиоавтограф 18%-ного денатурирующего ПААГ, демонстрирующего продукты расщепления миРНК-21 миРНКазми 21-FC-βр и 21-FC-αр. МиРНК (10 мкМ) и конъюгат (5 мкМ) инкубировали в буфере I при 37 °С в течение 72 ч. Дорожки Im и T1 – имидазольный лэддер и T1-лэддер, соответственно. Контроль – 5'- $[^{32}\text{P}]$ -миРНК-21 инкубировали в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК с миРНКазой (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК-21 под действием вилкоподобных миРНКаз. **В** – сайты расщепления миРНК-21 под действием 21-FC-βр и 21-FC-αр (показаны стрелками).

Сравнительный анализ эффективности расщепления миРНК 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 и 3 ч, соответственно.

Сравнительный анализ каталитической активности вилкоподобных миРНКаз и ранее разработанной шпилечной миРНКазы, на основе которой были сконструированы вилкоподобные структуры [45,47], выявил снижение эффективности расщепления мишени при включении в состав миРНКаз пептида через остаток дезоксирибозы. В условиях однооборотного катализа исходная шпилечная миРНКазы, в которой каталитический пептид был присоединён через аминоксильный линкер к 5'-фосфатной группе адресующей компоненты, расщепляла миРНК-21 с 85%-ной эффективностью за 24 ч [45] и превосходила по активности моно-пептидные миРНКазы 21-FC- α /21-FC- ρ и 21-FC- β /21-FC- ρ в 1.5 и 2.3 раза, соответственно, а также превышала активность наиболее эффективного бис-пептидного 21-FC- $\alpha\rho$ – 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- $\alpha\rho$ становится сопоставимой с параметрами расщепления для разработанной ранее шпилечной 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 адресующих доменов, количество, пространственную организацию и взаимное позиционирование каталитических пептидов, ориентацию каталитического домена относительно функциональных участков миРНК, композицию буферной среды, а также нуклеотидную последовательность миРНК-мишени.

Сравнительный анализ рибонуклеазной активности 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 миРНК-субстрата вилкоподобные миРНКазы обеспечивают 70%-ное расщепление мишени, а крабоподобные варианты достигают полного 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 более протяженные неразрывные комплементарные участки с миРНК-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 миРНК-молекул, могут проявлять высокую каталитическую активность в отношении более длинных типов РНК-мишеней, таких как клинически значимые мРНК, длинные некодирующие РНК и пре-миРНК. Исследования с использованием тРНК дрожжей в качестве модельного субстрата продемонстрировали, что сиквенс-специфические двойные конъюгаты обеспечивают расщепление мишени по пиримидин-Н связям в целевом одноцепочечном участке, а также эффективно гидролизуют G-N связи в областях РНК, удаленных от сайта нацеливания [269]. 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 увеличивает эффективность расщепления миРНК 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 [270,286,318]. 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-СС-pp) обеспечивает полную деградацию мишени в течение 24 ч, в то время как варианты с пептидом, присоединённым через остаток дезоксирибозы (21-СС-αα и 21-СС-ββ), демонстрируют лишь 25-35%-ное расщепление. Аналогично, моно-пептидные производные вилкоподобных миРНКаз с конъюгированием пептида посредством дезоксирибозы достигают лишь 40-55% деградации, тогда как ранее разработанные шпилечные 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 моно-пептидных миРНК-21-направленных ВС, бис-пептидных 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 миРНК, 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-СС-αα и 17-СС-αα, 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 миРНК-мишенью, присоединение каталитических пептидов через 5'-фосфатную группу посредством аминоксильного линкера, введение двух каталитических доменов с их пространственным разграничением для предотвращения взаимной стерической интерференции, а также наличие чувствительных сайтов в последовательности миРНК-мишени.

3.4. Исследование эффективности расщепления миРНК-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) [86].

Ранее было показано, что совместное применение миРНКазы и РНКазы Н1 приводит к синергическому расщеплению миРНК-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 способности синтезированных миРНКаз к кооперативному действию с РНКазой Н1 была проведена серия экспериментов по расщеплению миРНК-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. Исследования проводили в коммерческом буфере П, рекомендованном для реакций с участием РНКазы Н1.

Для подбора оптимальных условий ферментативного расщепления в экспериментах с двойными миРНКазами были протестированы две концентрации РНКазы Н1: 5 и 100 ед.акт./мл. В дальнейшем, для обеспечения корректного сопоставления данных по эффективности расщепления миРНК 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 миРНК при совместном действии двойных миРНКаз и РНКазы Н1

Дизайн двойных миРНКаз был реализован таким образом, чтобы гетеродуплексы ДС с комплементарными миРНК являлись потенциальными субстратами для РНКазы Н1. Для этого адресующие домены А и В в составе миРНКаз были синтезированы длиной 8–10 н., достаточной для взаимодействия с РНКазой Н1 и последующего расщепления ферментом (Рис. 11, Таблица 3). Как уже было сказано выше, в адресующих доменах аденины были заменены на 2-аминоаденины для увеличения эффективности связывания ДС с миРНК. Ранее было показано, что включение 2-аминоаденинов в последовательность антисмысловых олигонуклеотидов не препятствует активности РНКазы Н1 [319].

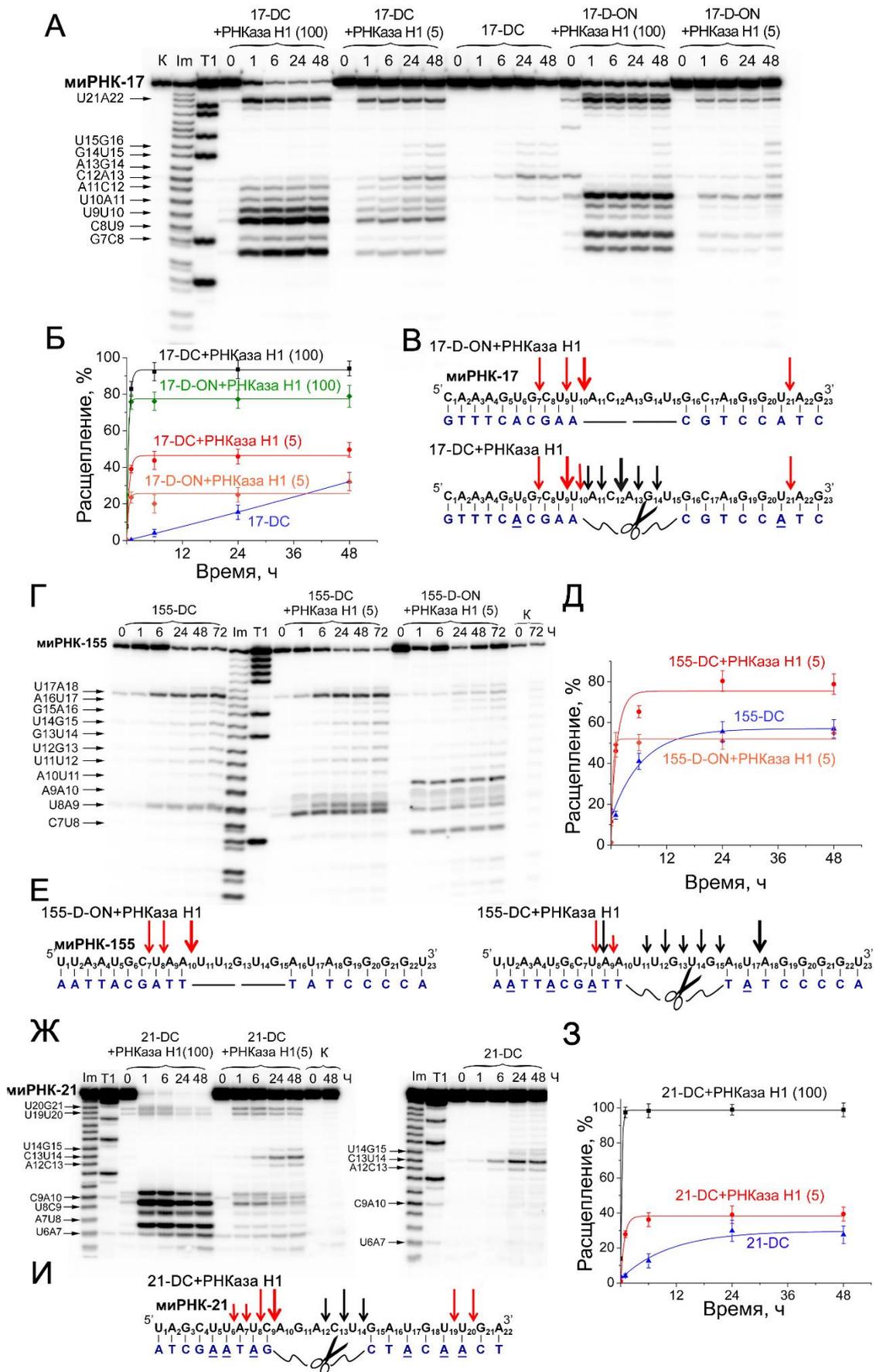


Рис. 35. Расщепление синтетических 5'-[³²P]-миРНК в комплексе с двойными миРНКазы (DC) или двойными олигонуклеотидами (D-ON) в присутствии РНКазы H1. А, Г, Ж – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17,

миРНК-155 и миРНК-21, соответственно, в условиях 20-кратного избытка миРНКаз или олигонуклеотидов. Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-миРНК (1 мкМ) и DC или D-ON (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]-миРНК инкубировали в присутствии РНКазы Н1 (100 ед. акт./мл) и в отсутствие D-ON и DC. Над дорожками обозначено время инкубации миРНК с конъюгатами (в часах). **Б, Д, З** – кинетические зависимости расщепления миРНК в комплексе с DC или D-ON в присутствии РНКазы Н1. **В, Е, И** – сайты расщепления миРНК в комплексе с DC или D-ON в присутствии РНКазы Н1. Красными стрелками показаны сайты расщепления миРНК под действием РНКазы Н1, черными стрелками – под действием двойной миРНКазы. **А** – 2-аминоаденин.

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 3). Результаты исследования эффективности расщепления миРНК 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. 35.

Анализ расщепления миРНК 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. 35 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 миРНК совместно с 17-DC и РНКазой Н1 к сайтам расщепления миРНК в области гетеродуплекса, характерным для РНКазы Н1, добавляются сайты расщепления, специфичные для конъюгата – U10-A11, A11-C12 и C12-A13 (Рис. 35 А и В). Исследование кинетики расщепления миРНК-17 показало, что при концентрации РНКазы Н1 5 и 100 ед. акт./мл на начальных этапах реакции, через 1 ч инкубации, суммарная эффективность расщепления миРНК-17 в комплексе с миРНКазой была в 1.7 и 1.1 раз выше, чем в комплексе с олигонуклеотидом, и в 78 и 166 раз выше, чем под действием одного конъюгата (Рис. 35 Б). Из рисунка видно, что расщепление миРНК в присутствии РНКазы Н1 достигает плато менее чем через 3 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 93%, соответственно, по сравнению с 25 и 77%, наблюдаемыми при РНКазы Н1-индуцируемом расщеплении миРНК в гетеродуплексе с 17-D-ON, и 15% под действием миРНКазы (Рис. 35 Б).

Сходные закономерности были отмечены в экспериментах по расщеплению миРНК-155 (Рис. 35 Г – Е). Основными сайтами расщепления миРНК в составе гетеродуплекса с олигонуклеотидом 155-D-ON 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. 33 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 через 24 ч инкубации суммарная эффективность расщепления миРНК-155 в комплексе с двойной миРНКазой в 1.6 раза выше, чем в комплексе с олигонуклеотидом (Рис. 35 Г и Д). При совместном действии 155-ДС и РНКазы Н1 расщепление миРНК-155 достигает плато уже к 6 ч инкубации, составляя 65%, что в 2 раза превышает степень деградации миРНК при использовании только ДС. Максимальная степень расщепления миРНК в присутствии РНКазы Н1, достигаемая через 24 ч инкубации, составляет 51% в комплексе с олигонуклеотидом и 80% в дуплексе с миРНКазой (Рис. 35 Г и Д).

Совместное действие двойной миРНКазы и РНКазы Н1 также было исследовано в реакции расщепления миРНК-21 (Рис. 35 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 (Рис. 35 Ж): (1) – продукты, полученные при расщеплении миРНК 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 миРНК в составе гетеродуплекса под действием РНКазы Н1 (сайты U6-A7, U8-C9, C9-A10 и U19-G20, U20-G21, соответственно) (Рис. 35 Ж и И). Спустя 1 ч инкубации эффективность расщепления в этих условиях увеличивается в 7 раз в сравнении с действием только ДС и к 24 ч достигает 39% (Рис. 35 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 адресующего 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 миРНК.

3.4.2. Исследование эффективности расщепления миРНК 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-BC- α или 17-BC- β) или двумя пептидами (17-BC- $\beta\beta$). Результаты экспериментов представлены на Рис. 36 и Рис. 37. При совместном применении

комплементарного олигонуклеотида 17-В-ОН и РНКазы Н1 расщепление мишени наблюдалось преимущественно в 3'-области РНК по связи G19-G20 (Рис. 36 А III). Кривая расщепления достигала плато к 1 ч, когда максимальная деградация РНК составляла 30% (Рис. 36 А III). При совместном применении РНКазы Н1 с конъюгатами 17-ВС-α (Рис. 36 А II) и 17-ВС-β (Рис. 36 А V) наблюдалось перераспределение сайтов расщепления, характерных 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 С12-А13 на U10-А11 (Рис. 36 А II, V), а РНКазы Н1, помимо основного сайта G19-G20, дополнительно обеспечивала слабое расщепление по сайтам G7-С8 и U6-G7 в 5'-области миРНК.

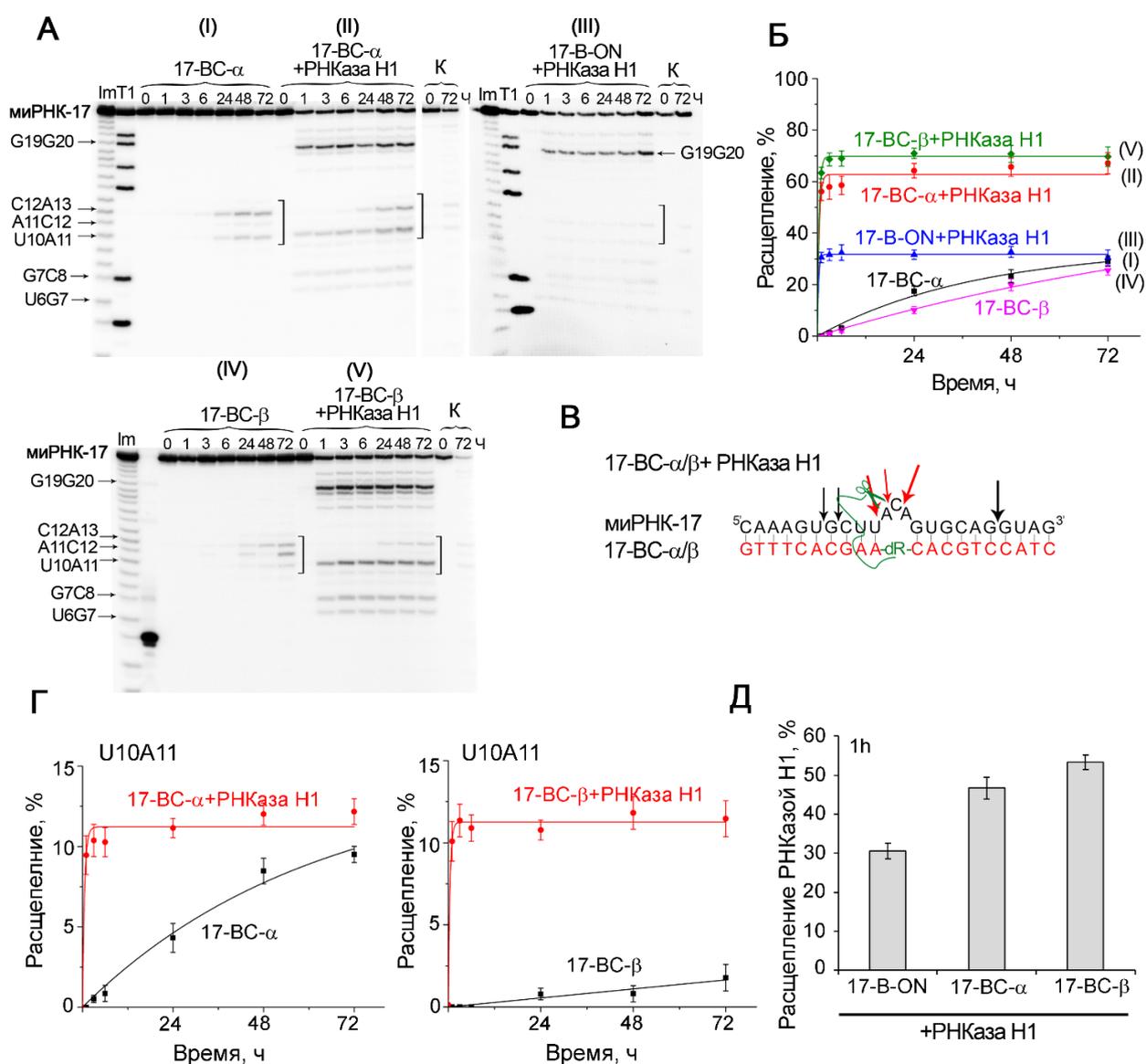


Рис. 36. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-17 в комплексе с петлеобразующим олигонуклеотидом 17-В-ОН или миРНКазой 17-ВС-α или 17-ВС-β в присутствии РНКазы Н1. А – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 миРНКазой 17-ВС-α (I), комбинацией 17-ВС-α и РНКазы Н1 (II),

РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 17-В-ОН (III), миРНКазой 17-ВС-β (IV), комбинацией 17-ВС-β и РНКазы Н1 (V). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-миРНК (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 миРНК миРНКазами 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 миРНКазами 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).

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 миРНКаз 17-ВС-α или 17-ВС-β достигала приблизительно 60% через 1 ч инкубации, что в 2 раза превышало расщепление миРНК-17 РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом и в 110-125 раз – деградацию под действием петлеобразующих миРНКаз (Рис. 36 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. 36 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. 36 Д). Следует отметить, что совместное применение РНКазы Н1 с миРНКазой 17-ВС-β, содержащей пептид в β-положении, обеспечивало более высокий уровень деградации мишени, чем в комбинации с 17-ВС-α. Для 17-ВС-β наблюдалось более выраженное усиление рибонуклеазной активности (Рис. 36 Б, Г, Д), что, вероятно, связано с более предпочтительной природной β-ориентацией пептида.

Еще более выраженное увеличение эффективности и скорости расщепления миРНК было обнаружено при совместном действии РНКазы Н1 и бис-пептидной петлеобразующей миРНКазы 17-ВС-ββ (Рис. 37 А II). Такая комбинация обеспечивала полную деградацию миРНК-17 менее чем за 24 ч инкубации, а значение $t_{1/2}$ составляло 6.0 ± 0.2 ч (Рис. 37 Б). Как и в случае монопептидных 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 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. 37 А II, В). Примечательно, что расщепление по сайтам G7-C8 и U6-G7 под действием РНКазы Н1 становится возможным только после предварительного расщепления области петли миРНКазы. Максимальная эффективность расщепления миРНК при сочетанном применении рибонуклеаз достигается уже к 24 ч и составляет 96%.

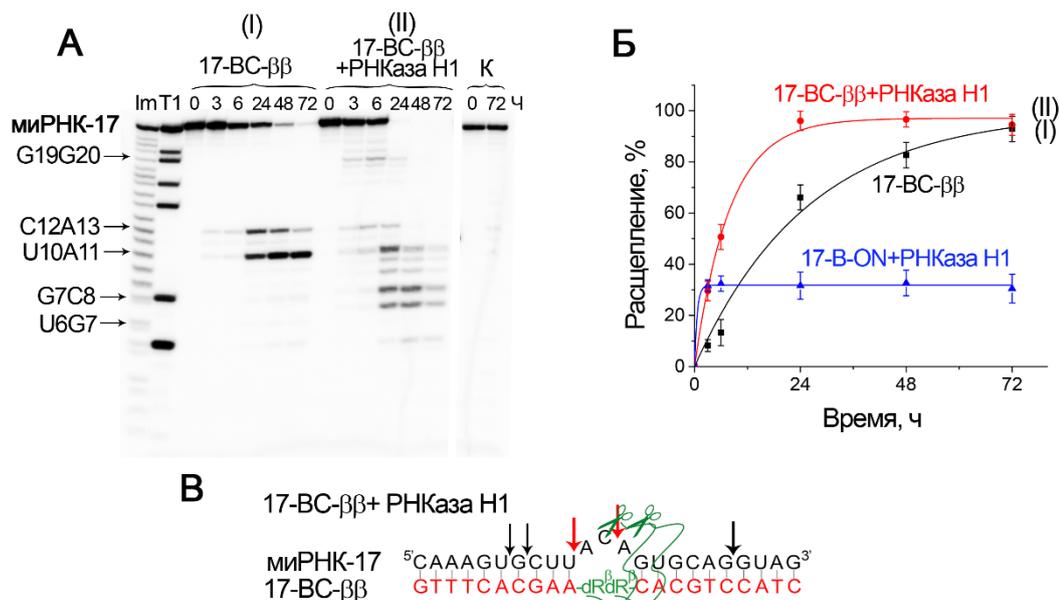


Рис. 37. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-17 миРНКазой с двумя пептидами 17-BC-ββ и/или РНКазой Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 под действием миРНКазы 17-BC-ββ (**I**) и при совместном действии 17-BC-ββ и РНКазы Н1 (**II**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-миРНК (1 мкМ) и BC (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 миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). Квадратной скобкой обозначена область выпетливания РНК. **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК 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 миРНК 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), происходит замедление скорости расщепления мишеней под действием крабоподобных миРНКаз (Рис. 38). 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 ч, что превосходило эффективность, наблюдаемую при использовании буфера I, не содержащего магний (Рис. 38 А). миРНКазы 17-СС-αα демонстрировала более выраженное замедление реакции в буфере II: степень деградации миРНК снижалась вдвое и составляла 49% через 24 ч (Рис. 38 Б). Согласно расчётам с использованием сервиса DINAMelt, температура плавления дуплексов миРНК-21/21-СС-pp и миРНК-17/17-СС-αα при повышенной концентрации ионов Mg^{2+} (8мМ) увеличивается 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 миРНК 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 миРНК.

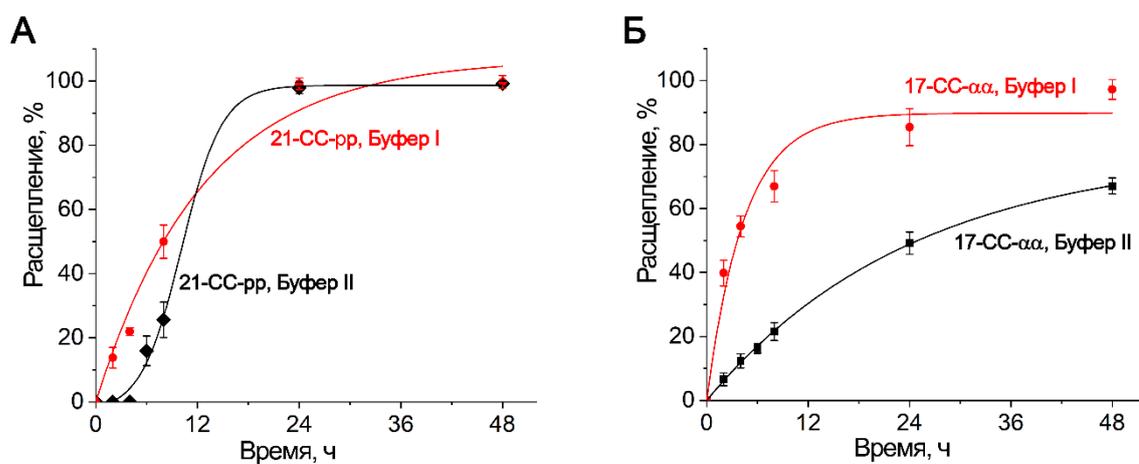


Рис. 38. Кинетические зависимости расщепления 5'-[^{32}P]-миРНК-21 (А) и 5'-[^{32}P]-миРНК-17 (Б) миРНКазы 21-СС-pp и 17-СС-αα, соответственно, в двух буферных системах. Дуплексы, сформированные 5'-[^{32}P]-миРНК (10 мкМ) и миРНКазой (5 мкМ) инкубировали в буфере I или II при 37 °С в течение 48 ч.

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 миРНК (10 мкМ) по отношению к миРНКазе или олигонуклеотиду (5 мкМ) (Рис. 39, Рис. 40).

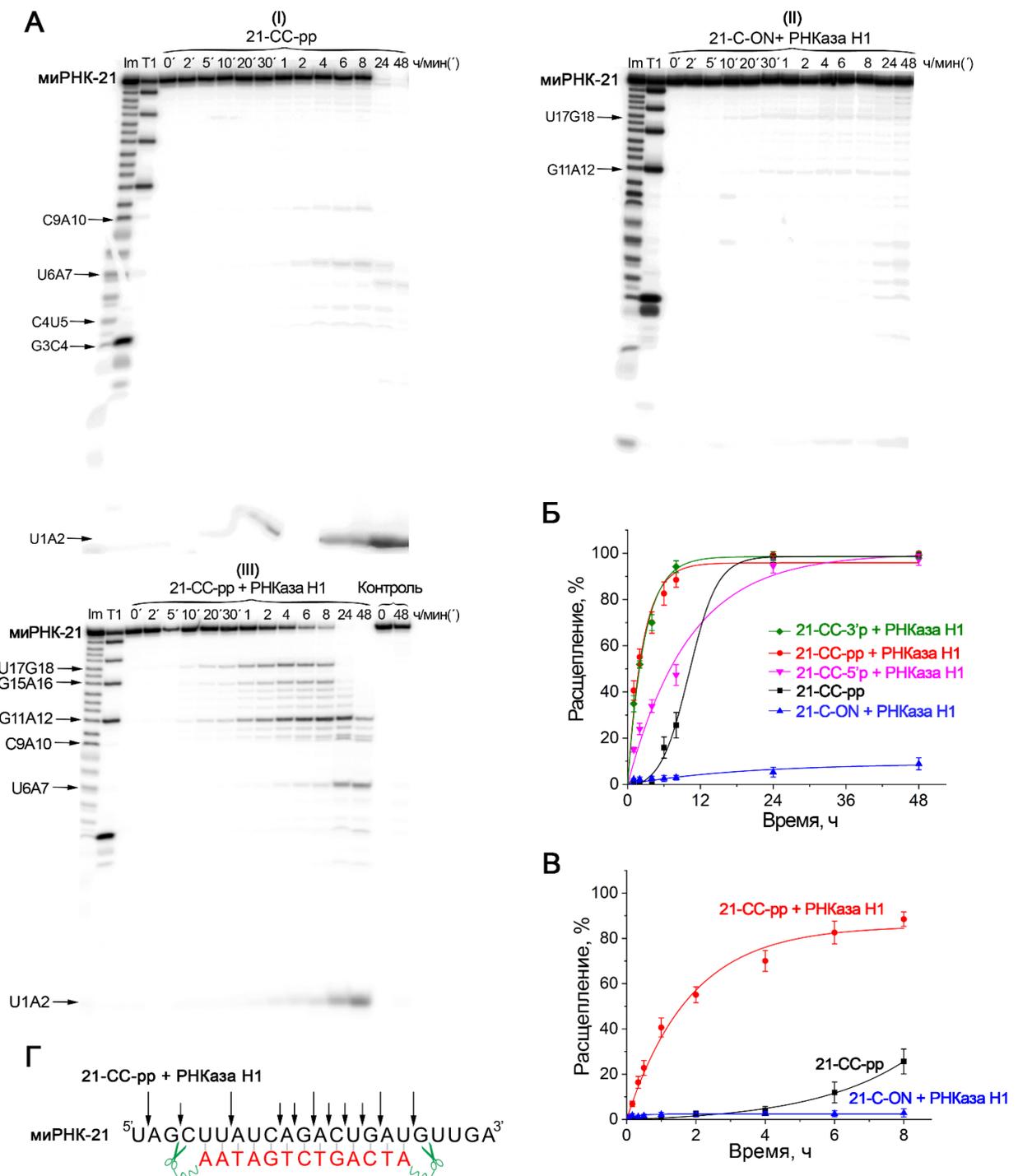


Рис. 39. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-21 в комплексе с олигонуклеотидом 21-С-ОН или крабоподобной миРНКазой 21-СС-pp в присутствии РНКазы Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 миРНКазой 21-СС-pp (**I**), РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 21-С-ОН (**II**), комбинацией 21-СС-pp и РНКазы Н1 (**III**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-миРНК (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'-[³²P]-миРНК-21 инкубировали в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие олигонуклеотида и миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК миРНКазой 21-СС-pp, 21-СС-3'-p и 21-СС-5'-p и/или РНКазой Н1 в течение 48 ч инкубации. **В** – кинетические зависимости расщепления миРНК миРНКазой 21-СС-pp и/или РНКазой Н1 в первые 8 ч инкубации. **Г** – основные сайты

расщепления миРНК-21 при совместном действии крабоводобной миРНКазы 21-СС- α и РНКазы Н1.

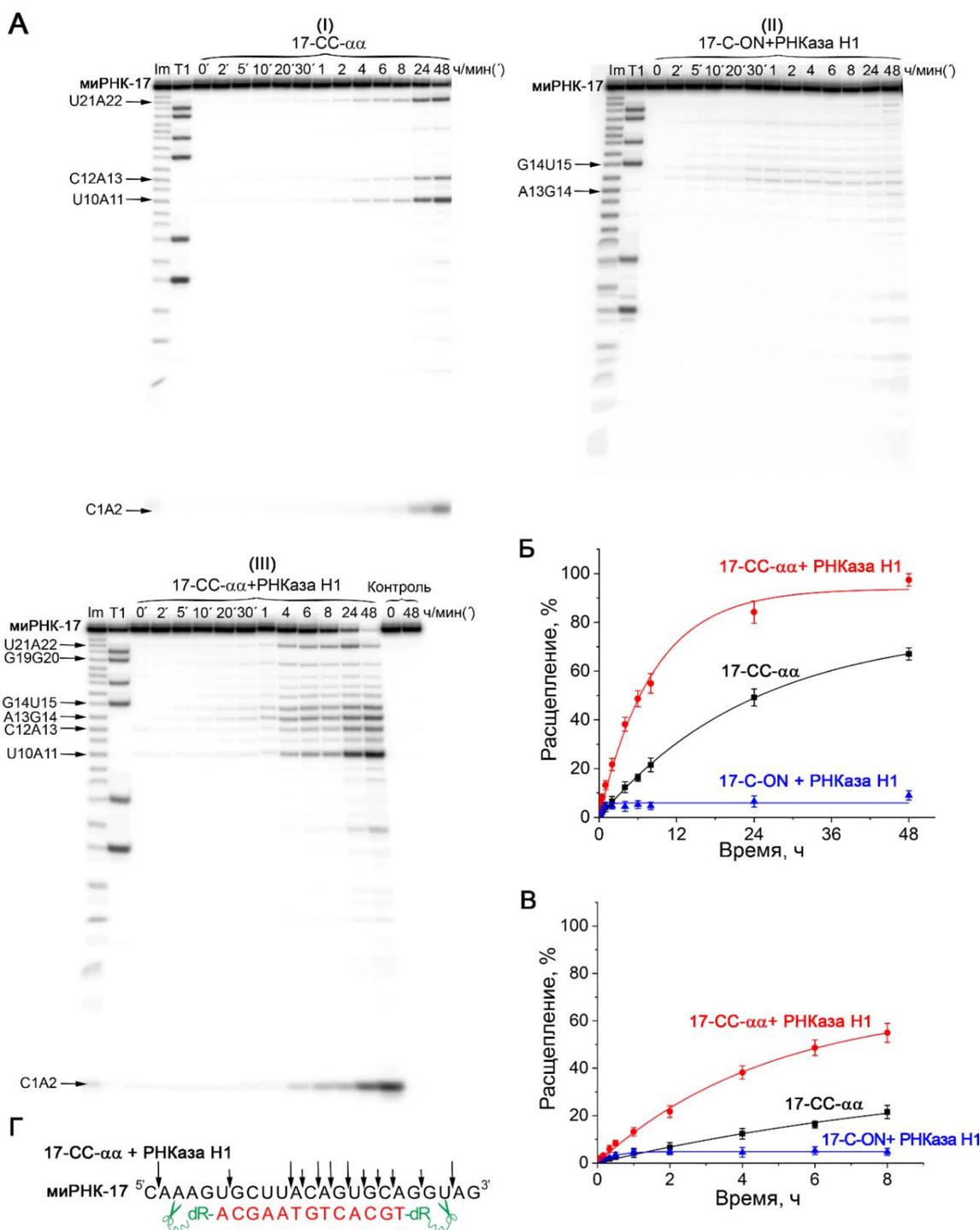


Рис. 40. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-17 в комплексе с олигонуклеотидом 17-С-ОН или крабоводобной миРНКазой 17-СС- α в присутствии РНКазы Н1. А – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-17 миРНКазой 17-СС- α (I), РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 17-С-ОН (II), комбинацией 17-СС- α и РНКазы Н1 (III). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-миРНК (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'-[³²P]-миРНК-17 инкубировали в присутствии РНКазы Н1 и в отсутствие

олигонуклеотида и миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). **Б** – кинетические зависимости расщепления миРНК миРНКазой и/или РНКазой Н1 в течение 48 ч инкубации. **В** – кинетические зависимости расщепления миРНК 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 миРНК показал, что совместное применение крабоподобных миРНКаз и РНКазы Н1 приводит к значительному увеличению скорости накопления продуктов, образующихся в результате расщепления миРНК в центральной области гетеродуплекса под действием РНКазы Н1 (Рис. 39 А, Г, Рис. 40 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 миРНК. Так, дополнительно наблюдалось расщепление миРНК-21 по сайтам U17-G18 под действием 21-СС- $\rho\rho$ и миРНК-17 по связи G19-G20 под действием 17-СС- $\alpha\alpha$ (Рис. 39 А III, Г, Рис. 40 А III, Г), что может быть обусловлено усилением активности пептида, расположенного на 3'-конце адресующей компоненты миРНКазы.

Анализ эффективности расщепления показал, что применение РНКазы Н1 в концентрации 5 ед. акт./мл обеспечивает низкую степень расщепления миРНК-21 и миРНК-17 в комплексе с олигонуклеотидами 21-С-ОН и 17-С-ОН, которая не превышает 5% через 24 ч инкубации (Рис. 39 Б и Рис. 40 Б). При этом совместное применение РНКазы Н1 и крабоподобных миРНКаз вызывает резкое увеличение скорости и степени расщепления миРНК-мишени (Рис. 39 и 40). Наиболее выраженное ускорение реакции наблюдается в первые часы инкубации. При одновременном действии 21-СС- $\rho\rho$ и РНКазы Н1 степень деградации миРНК-21 достигала 40% уже через 1 ч, тогда как при независимом применении ферментов уровень расщепления не превышал 2% за этот же период времени (Рис. 39 В). Аналогично, при совместном действии 17-СС- $\alpha\alpha$ и РНКазы Н1 расщепление миРНК-17 достигало 13% через 1 ч, что значительно превышало активность каждого фермента по отдельности – степень деградации составляла лишь 4% (Рис. 40 В). Следует отметить, что 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- $\rho\rho$ и РНКазы Н1 достигалась уже через 12 ч инкубации ($t_{1/2} = 1.89 \pm 0.08$ ч), тогда как для миРНК-17 – через 48 ч ($t_{1/2} = 6.53 \pm 0.19$ ч) (Рис. 39 Б и Рис. 40 Б). Обнаруженные различия могут быть обусловлены несколькими факторами: (1)

нуклеотидной последовательностью, (2) термодинамическими параметрами внутримолекулярных структур различных миРНК 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.

С целью определения функциональной значимости бис-пептидной структуры крабоподобных миРНКаз для реализации синергического действия с РНКазой Н1, а также исследования роли позиции присоединения пептида по 3'- или 5'-концу в эффективности катализа, были проведены эксперименты по расщеплению миРНК-21 при совместном действии РНКазы Н1 и моно-пептидных миРНКаз 21-СС-5'р или 21-СС-3'р (Рис. 41, Рис. 39 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. В частности, в присутствии РНКазы Н1 степень расщепления мишени спустя 1 ч инкубации достигала 35% для 21-СС-3'р ($t_{1/2} = 1.9 \pm 0.1$ ч), что сопоставимо с эффектом для бис-пептидного варианта 21-СС-pp, и 15% для 21-СС-5'р ($t_{1/2} = 6.9 \pm 0.2$ ч). Таким образом, можно видеть, что сочетанное действие РНКазы Н1 и 21-СС-3'р в 2.3 раза превышает эффект комбинации с 21-СС-5'р. (Рис. 39 Б). Полученные данные свидетельствуют о ключевой роли 3'-пептида в обеспечении синергического действия с РНКазой Н1.

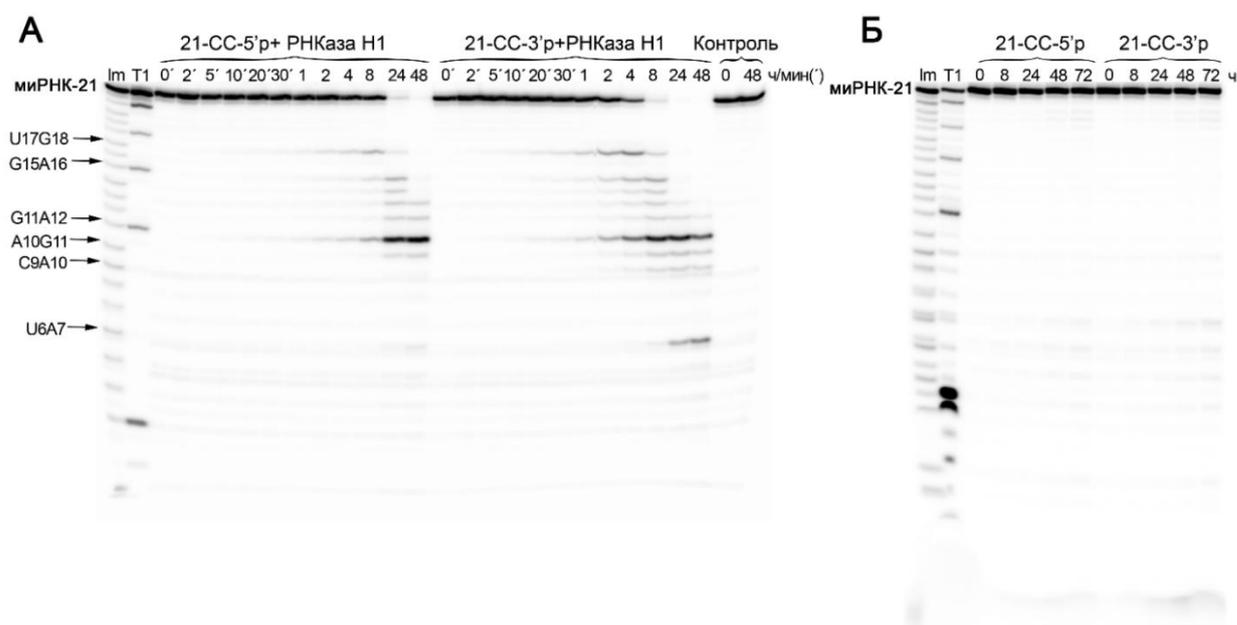


Рис. 41. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-21 крабоподобными моно-пептидными миРНКазами 21-СС-5'р и 21-СС-3'р в присутствии РНКазы Н1. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 миРНКазами 21-СС-3'р и 21-СС-5'р в присутствии РНКазы Н1 (**А**) и миРНКазами 21-СС-3'р и 21-СС-5'р (**Б**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-миРНК (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 Н1 и в отсутствие миРНКаз. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах).

3.4.4. Исследование эффективности расщепления миРНК 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 (миРНК – 10 мкМ и 21-FC – 5 мкМ) в буфере II.

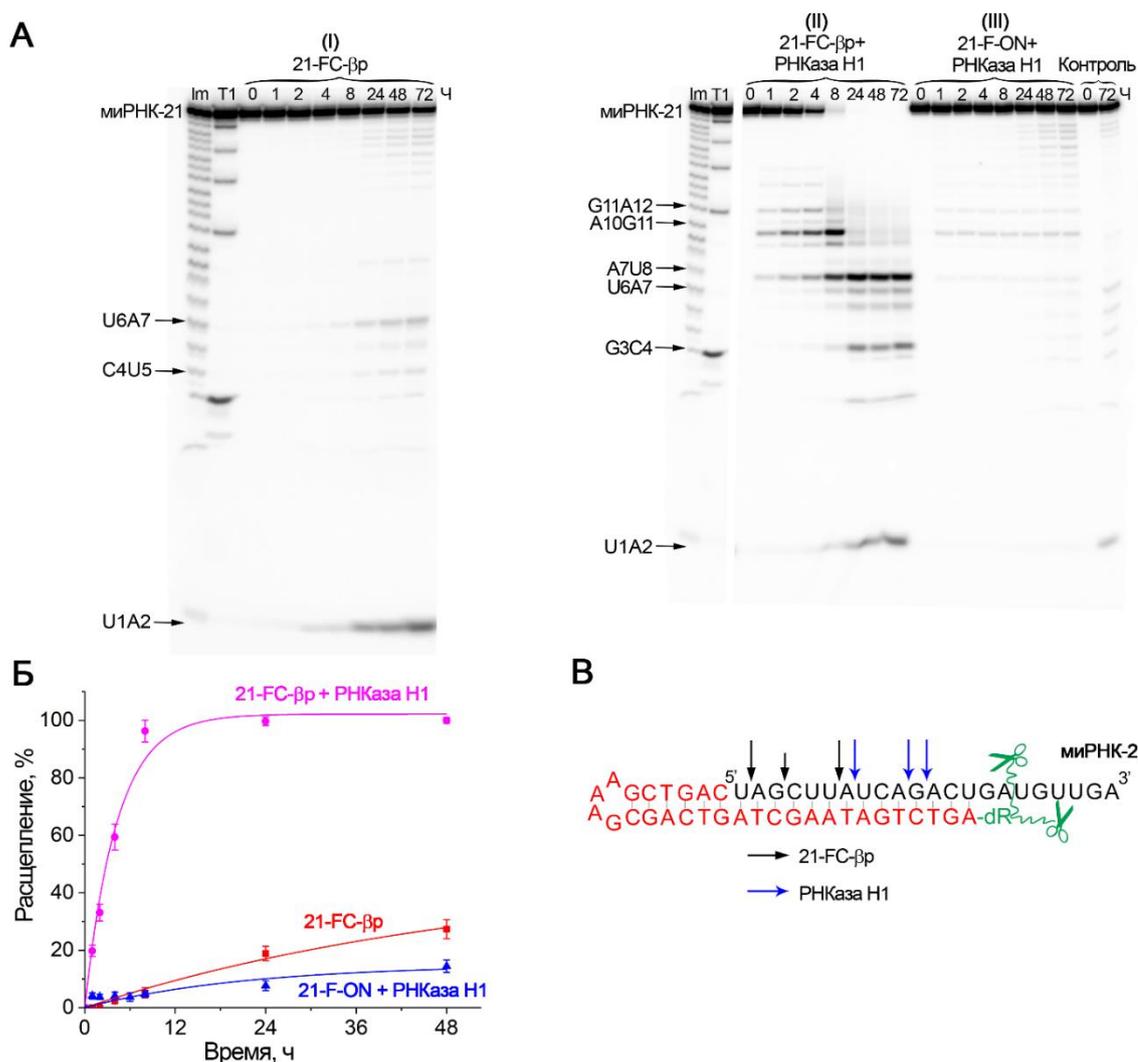


Рис. 42. Расщепление синтетической 5'-[³²P]-миРНК-21 в комплексе с олигонуклеотидом 21-F-ON или вилкоподобной миРНКазой 21-FC-βр в присутствии РНКазы Н1. **А** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 миРНКазой 21-FC-βр (**I**), комбинацией 21-FC-βр и РНКазы Н1 (**II**), РНКазой Н1 в комплексе с олигонуклеотидом 21-F-ON (**III**). Дуплексы, сформированные 5'-[³²P]-миРНК (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 Н1 и в отсутствие олигонуклеотида и миРНКазы. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах). **Б** – кинетические

зависимости расщепления миРНК-21 миРНКазой 21-FC-βр и/или РНКазой Н1. **В** – основные сайты расщепления миРНК-21 при совместном действии вилкоподобной миРНКазы 21-FC-βр (черные стрелки) и РНКазы Н1 (синие стрелки).

Подобно крабоподобным миРНКазам, вилкоподобные конструкции демонстрировали значительное снижение каталитической активности в буфере II, содержащем 8 мМ MgCl₂. Эффективность расщепления миРНК-21 под действием 21-FC-βр сокращалась в 2 раза и составляла 20% через 24 ч (Рис. 42). 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.

Паттерн расщепления миРНК при совместном действии РНКазы Н1 и FC включал как гидролиз по сайтам, характерным для миРНКазы, U1-A2, G3-C4, U6-A7, так и по связям в области гетеродуплекса A7-U8, A10-G11, G11-A12, специфичным для РНКазы Н1 (Рис. 42 В). 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 8% за 24 ч (Рис. 42 А III 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 ($t_{1/2} = 2.9 \pm 0.1$ ч).

Экспериментальный анализ показал, что в условиях, близких к внутриклеточным, все разработанные миРНКазы способны формировать гетеродуплексы с миРНК-мишенями, обладающие субстратными свойствами по отношению к РНКазе Н1. Помимо собственной рибонуклеазной активности миРНКаз способность рекрутировать внутриклеточную РНКазу Н1 обеспечивает дополнительное расщепление миРНК в области гетеродуплекса и значительно повышает эффективность её деградации. При совместном действии двух ферментов наблюдается синергический эффект, и степень расщепления увеличивается от 3 до 120 раз в зависимости от типа миРНКазы, избытка миРНК в реакции, концентрации РНКазы Н1 и последовательности мишени. Следует отметить, что наиболее выраженный синергический эффект на ранних этапах реакции (1 ч) наблюдался для менее активных вариантов миРНКаз: двойных и петлеобразующих конструкций. 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 миРНК одновременно в двух областях, что значительно усиливает общую каталитическую эффективность системы. Однако при оценке суммарной эффективности расщепления выявлено, что среди разработанных конструкций наибольший эффект в комбинации с РНКазой Н1 продемонстрировали крабоподобные, вилкоподобные и бис-пептидные петлеобразующие миРНКазы, которые показали количественное расщепление мишени в условиях многооборотной реакции за 8 – 24 ч. Высокая каталитическая эффективность определяется уникальным сочетанием структурных и каталитических свойств 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 их способность при совместном применении с РНКазой Н1 обеспечивать деградацию миРНК по всей длине молекулы: одноцепочечные области расщепляются миРНКазой, а области гетеродуплекса – РНКазой Н1 (Рис. 43). Такой механизм обеспечивает более надежную инактивацию миРНК вследствие её полного разрушения.

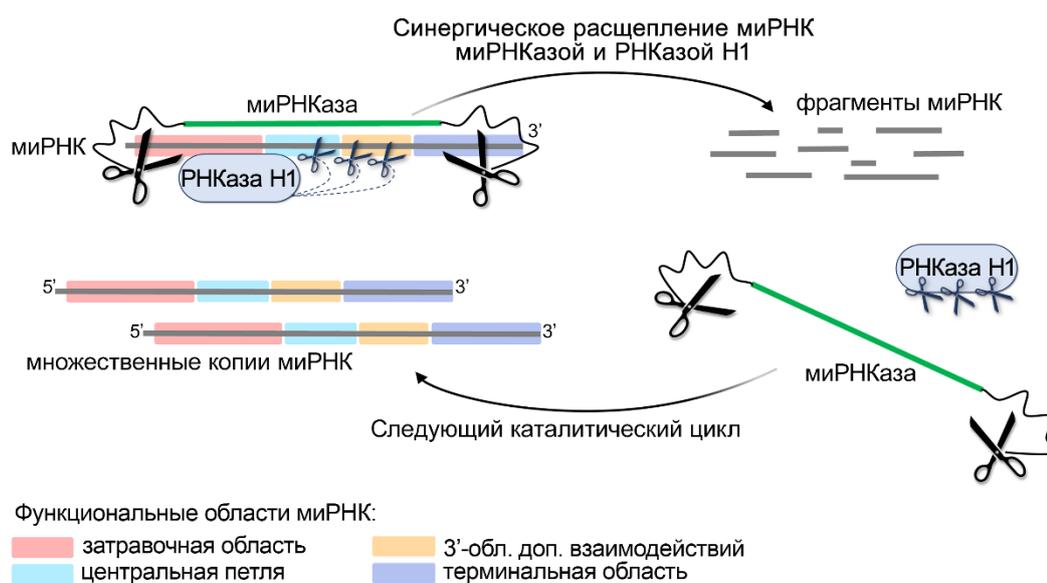


Рис. 43. Синергическая деградация миРНК под действием миРНКазы и РНКазы Н1. Совместное действие миРНКазы (в качестве примера изображена крабоподобная миРНКаза) и РНКазы Н1 приводит к деградации миРНК по всем функционально значимым областям с образованием коротких РНК-фрагментов, что приводит к быстрой диссоциации и высвобождению миРНКазы и РНКазы Н1 для следующего каталитического цикла.

Синергический эффект кооперативного действия миРНКазы и РНКазы Н1 может быть обусловлен рядом факторов: стерическим вытеснением каталитических пептидов из неэффективных конформаций и их более продуктивным позиционированием в область наиболее восприимчивых одноцепочечных участков 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 H1 и усиливать её активность [106]. На этом основании можно предположить, что дополнительный вклад в наблюдаемый синергический эффект может вносить пептид в составе миРНКаз, способствующий потенцированию активности РНКазы H1.

Таким образом, совместное использование миРНКаз и РНКазы H1, вне сомнений, представляет собой перспективную стратегию для дальнейшего применения на линиях опухолевых клеток, поскольку сможет обеспечить эффективную инактивацию целевой миРНК 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% БЭС обладает нуклеазной активностью, эквивалентной или даже превышающей сыворотку взрослого человека [320].

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 по концам адресующего 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- $\alpha\alpha$ (Таблица 3), имеющего структуру крабоподобной миРНКазы, но содержащий олигонуклеотидный компонент, который не имеет мишени в геноме млекопитающих. Электрофоретический анализ показал, что конъюгат Scr-CC- $\alpha\alpha$ проявлял

значительно более высокую нуклеазоустойчивость по сравнению с соответствующим олигонуклеотидом Scr-C-ON- α , не содержащим каталитических пептидов. Через 72 ч инкубации приблизительно 15% СС оставалось в интактном состоянии, тогда как олигонуклеотид подвергался полной деградации в течение первых двух часов инкубации (Рис. 44). Период полужизни Scr-CC- α составил 4 ч, что в 8 раз превышает $t_{1/2}$ для неконъюгированного олигонуклеотида ($t_{1/2} \approx 0.5$ ч).

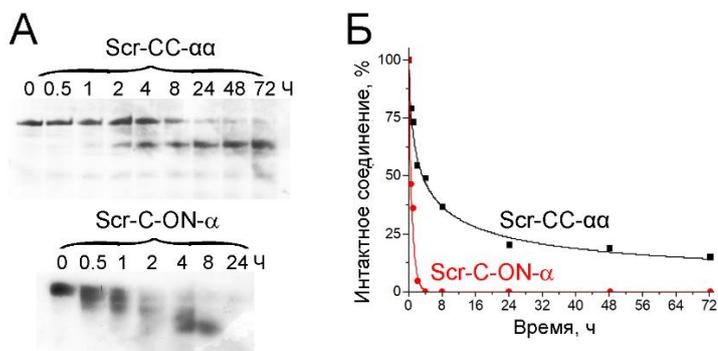


Рис. 44. Стабильность крабоподобного конъюгата Scr-CC- α и соответствующего олигонуклеотида Scr-C-ON- α в ростовой среде DMEM, содержащей 10%-ную БЭС. **А** – продукты деградации конъюгата Scr-CC- α и олигонуклеотида Scr-C-ON- α в 18%-ном денатурирующем ПААГ, окрашенным Stains-All. Реакцию проводили при 37 °С. Над дорожками обозначено время инкубации соединения (в часах). **Б** – степень деградации соединений в зависимости от времени инкубации.

3.5.3. Исследование нуклеазоустойчивости вилкоподобных миРНКаз

В предыдущих исследованиях по изучению нуклеазоустойчивости шпилечной миРНКазы, являющейся прототипом вилкоподобных миРНКаз, было показано, что в среде с 10%-ной БЭС соединение остается интактным на 95% в течение 48 ч [47]. Для оценки устойчивости вилкоподобных миРНКаз в более жестких условиях была проанализирована стабильность неспецифичного конъюгата Scr-FC- β p при инкубации в ростовой среде, содержащей 50%-ную БЭС (Рис. 45).

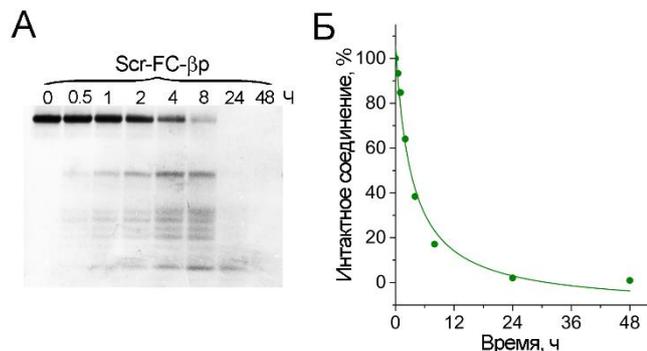


Рис. 45. Стабильность вилкоподобного конъюгата Scr-FC- β p в ростовой среде DMEM, содержащей 50%-ную БЭС. **А** – продукты деградации конъюгата Scr-FC- β p в 18%-ном денатурирующем ПААГ, окрашенным Stains-All. Реакцию проводили при 37 °С. Над дорожками

обозначено время инкубации соединения (в часах). **Б** – степень деградации соединений в зависимости от времени инкубации.

Анализ данных показал, что шпилечная структура на 3'-конце и два фланкирующих пептида на 5'-конце адресующего олигонуклеотида в структуре вилкоподобных миРНКаз обеспечивают высокую устойчивость к нуклеазам. Согласно электрофоретическому анализу, структурно целостный конъюгат детектировали в смесях даже через 8 ч инкубации при 37 °С (Рис. 45), а период полужизни составлял около 3 ч. Высокая нуклеазоустойчивость вилкоподобных миРНКаз может способствовать их пролонгированному ингибирующему действию *in vivo*.

Таким образом, крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы демонстрируют высокую степень нуклеазоустойчивости, сопоставимую с химически модифицированными анти-миРНК олигонуклеотидами, широко применяемыми в трансляционных исследованиях [308]. В частности, разработанные крабоподобные миРНКазы, превосходят по стабильности ДНК/LNA и 2'-ОМе/LNA миксеры, которые полностью деградируют в течение 6 ч в присутствии 10%-ной сыворотки, и проявляют сравнимую нуклеазоустойчивость с ДНК-, LNA- и ДНК/LNA-миксерами, защищенными дополнительными тремя фосфоротиоатными модификациями по 5'- и 3'-концам [308].

Полученные результаты показывают, что введение в структуру миРНКаз, содержащих немодифицированный адресующий 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 проводили для крабоподобных и вилкоподобных миРНКаз, которые характеризовались наиболее высокой рибонуклеазной активностью и высоким уровнем синергии с РНКазой H1. Исследование биологического действия миРНКаз включало оценку степени подавления миРНК-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 крабовидных миРНКаз на линиях опухолевых клеток *in vitro*

МиРНК отличаются от других типов внутриклеточных РНК высокой концентрацией, биологической стабильностью и длительным временем полужизни [183,321]. МиРНК-21 является одной из наиболее представленных миРНК в эукариотических клетках, в особенности при неопластической трансформации, когда её уровень дополнительно многократно возрастает. В зависимости от условий, внутриклеточная концентрация миРНК-21 может варьировать от 0.5 до 22 мкМ [321,322].

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

Для оценки биологической активности миРНКаз в качестве контрольного соединения в клеточных экспериментах использовали неспецифический крабовидный конъюгат Scr-CC-αα. В экспериментах с синтетическими 5'-[³²P]-миРНК-21 или 5'-[³²P]-миРНК-17 было установлено, что контрольный конъюгат Scr-CC-αα проявляет низкую рибонуклеазную активность. При инкубации контрольного конъюгата с миРНК в буфере I при молярном соотношении миРНК/миРНКазы = 1/5 степень расщепления составляла 14% для миРНК-21 и 9% для миРНК-17 через 24 ч (Рис. 46). 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-CC-αα проявлял низкую рибонуклеазную активность, а также не способен специфически связываться с РНК в клетке, можно предположить, что его неспецифическое действие на клеточных культурах будет минимальным.

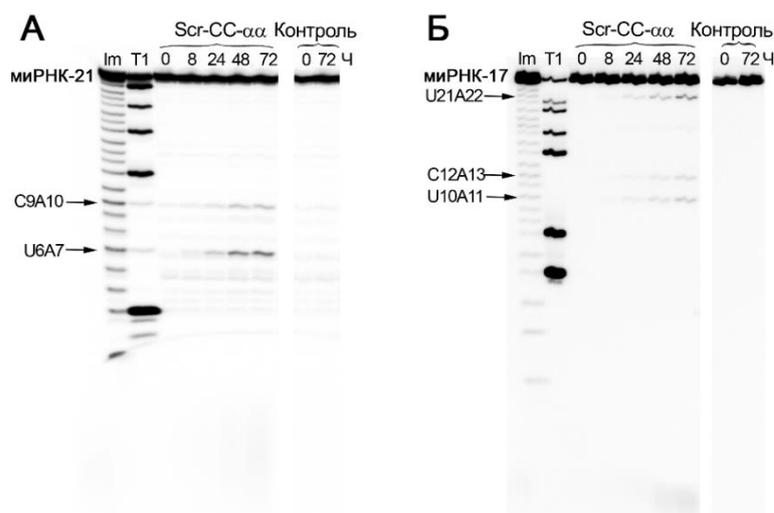


Рис. 46. Расщепление синтетических 5'-[³²P]-миРНК-21 и 5'-[³²P]-миРНК-17 под действием контрольного крабоподобного конъюгата Scr-CC-αα. **А, Б** – радиоавтографы 18%-ных денатурирующих ПААГ, демонстрирующие продукты расщепления миРНК-21 (**А**) и миРНК-17 конъюгатом Scr-CC-αα. 5'-[³²P]-миРНК (1 мкМ) и Scr-CC-αα (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 инкубировали в отсутствие конъюгата. Над дорожками обозначено время инкубации (в часах).

Для оценки способности крабоподобных миРНКаз снижать уровень миРНК-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-αα, 21-CC-ββ, 21-CC-pp, 17-CC-αα сравнивали как с действием неспецифического конъюгата Scr-CC-αα, так и с соответствующими антисмысловыми олигонуклеотидами 21-С-ОН или 17-С-ОН, не содержащими каталитических пептидов. Согласно данным ПЦР анализа (Рис. 47 А и Б), контрольное соединение Scr-CC-αα не влияло на уровень миРНК-21 и миРНК-17 в клетках MCF-7. Анализ кинетики подавления миРНК показал, что применение комплементарных олигонуклеотидов и крабоподобных миРНКаз приводило к снижению уровня мишеней с максимальным эффектом, достигаемым к 24 ч после трансфекции (Рис. 47 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 составила 30-40% (Рис. 47 А и Б). Среди миРНК-21-направленных крабоподобных миРНКаз, наибольший ингибирующий эффект продемонстрировал 21-CC-pp, который приводил к снижению уровня миРНК-21 на 65% (Рис. 47 А). К 48 ч уровень миРНК-21 восстанавливался до 50 % и оставался стабильным до 72 ч. 21-CC-αα приводил к 55%-ному подавлению миРНК-21, а наименьший эффект продемонстрировал 21-CC-ββ, под действием которого уровень миРНК-21 снижался на 30% через 24 ч, что сопоставимо с действием антисмыслового олигонуклеотида 21-С-ОН (Рис. 47 А).

миРНК-17-направленная миРНКаза 17-СС- $\alpha\alpha$ вызывала выраженное снижение уровня миРНК-17, достигающее 58% (Рис. 47 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 миРНК-ингибирующего эффекта. Наиболее каталитически активная миРНКаза 21-СС-pp в исследуемой серии индуцировала максимальное снижение уровня мишени.

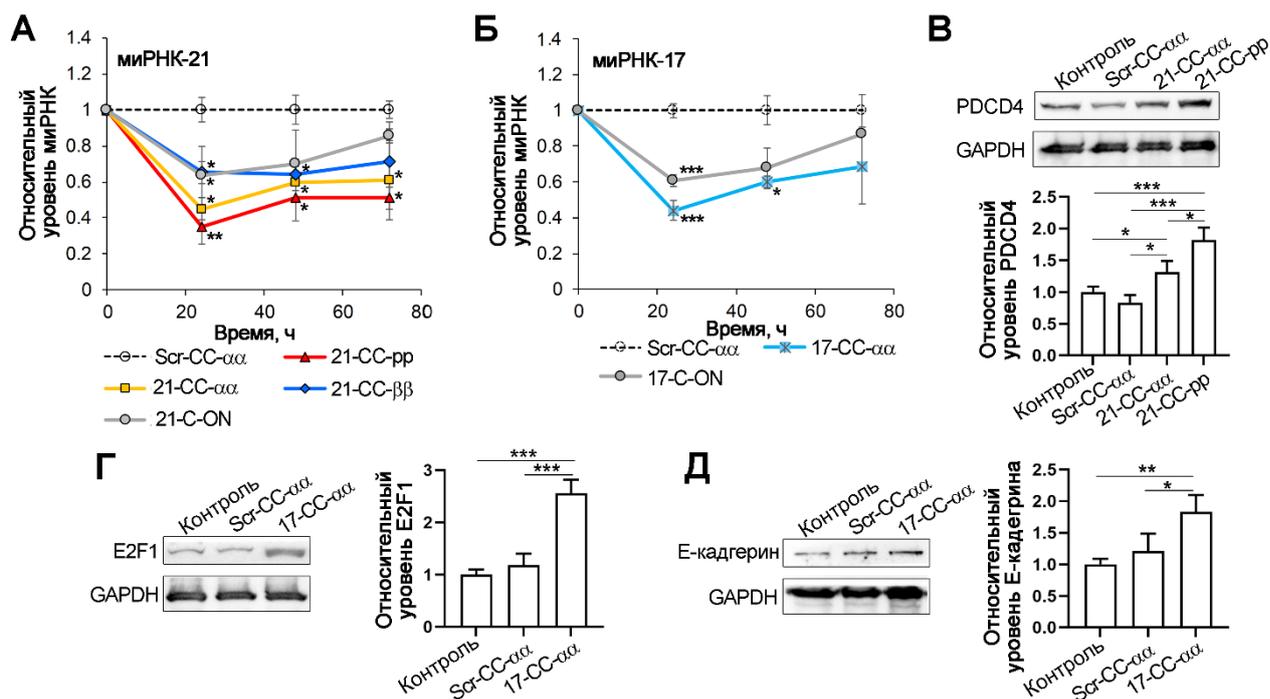


Рис. 47. Биологическая активность крабоподобных миРНКаз в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. **А, Б** – кинетика снижения уровня миРНК-21 в клетках MCF-7 под действием крабоподобных миРНКаз 21-СС-pp, 21-СС- $\alpha\alpha$ и 21-СС- $\beta\beta$ и олигонуклеотида 21-С-ОН (**А**), и снижение уровня миРНК-17 под действием 17-СС- $\alpha\alpha$ и 17-С-ОН (**Б**). Оценка уровней миРНК-21 и миРНК-17 проведена с помощью метода stem-loop ПЦР. Эффективность специфических миРНКаз оценивали в сравнении с контрольным неспецифическим конъюгатом Scr-CC- $\alpha\alpha$. Уровень миРНК нормировали на уровень мРНК U6. *, ** и *** – статистически значимые отличия от контрольного конъюгата Scr-CC- $\alpha\alpha$ с $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$, соответственно. **В – Д** – уровни белков PDCD4 (**В**), E2F1 (**Г**) и E-кадгерина (**Д**), определенные методом Вестерн-блот анализа через 72 ч после трансфекции клеток MCF-7 крабоподобными миРНКазами 21-СС- $\alpha\alpha$, 21-СС-pp (**В**) и 17-СС- $\alpha\alpha$ (**Г, Д**). Уровни белков нормировали на уровень белка GAPDH. Контроль – интактные клетки. *, ** и *** – статистически значимые отличия с $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$. Трансфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine™ 2000 при концентрации соединений 1 мкМ.

Специфичность подавления экспрессии миРНК под действием миРНКаз дополнительно оценивали посредством анализа уровня некомplementарной миРНК let-7g. Анализ показал, что миРНК-21- и миРНК-17-направленные крабоподобные миРНКазы одновременно со

значительным снижением уровней комплементарных мишеней (Рис. 47 А и Б), не оказывали влияния на уровень let-7g через 24 ч после трансфекции (Рис. 48), что подтверждает сиквенс-специфичность разработанных ингибиторов миРНК.

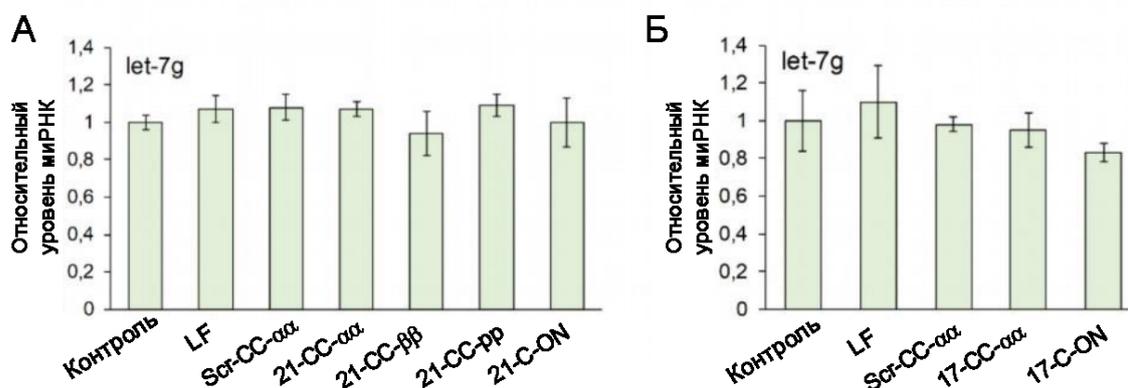


Рис. 48. Уровень миРНК let7-g в клетках MCF-7 через 24 ч после трансфекции миРНК-21-направленными крабоподобными миРНКазы 21-CC-αα, 21-CC-ββ, 21-CC-pp и олигонуклеотидом 21-C-ON (А), и миРНК-17-направленной миРНКазой 17-CC-αα и олигонуклеотидом 17-C-ON (Б). Трансфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine™ 2000 при концентрации соединений 1 мкМ. Относительный уровень РНК определяли методом stem-loop ПЦР. Контроль – интактные клетки. LF - клетки, инкубированные только с Lipofectamine™ 2000. Уровень миРНК нормировали на уровень мяРНК U6.

Одновременно с этим специфичность действия крабоподобных миРНКаз была подтверждена путём анализа изменения уровней белков, регулируемых миРНК-21 и миРНК-17. Подавление миРНК-21 под действием 21-CC-αα и 21-CC-pp в клетках MCF-7 приводило к увеличению уровня белка-супрессора опухолей PDCD4 (от англ. programmed cell death 4) [323] в 1.35 и 1.7 раз, соответственно (Рис. 47 В). Аналогично, ингибирование миРНК-17 приводило к увеличению уровня белка E2F1 [324] в 1.9 раз и белка клеточной адгезии Е-кадгерина [325] в 1.5 раз в клетках MCF-7 (Рис. 47 Г и Д). Эти результаты дополнительно подтверждают специфичность действия разработанных ингибиторов миРНК.

Повышенный уровень миРНК-21 и миРНК-17 напрямую связан с ключевыми процессами опухолевого роста, такими как неконтролируемая пролиферация, ингибирование апоптоза, повышенная миграция и инвазия [288,290,291]. 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 A549 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 антипролиферативному действию продемонстрировали клетки MCF-7 и A549: миРНКазы вызывали снижение пролиферативной активности клеток MCF-7 на 30-35% (Рис. 49

А), а клеток А549 на 50% через 48 ч (Рис. 49 А). Вместе с этим, крабоподобные миРНКазы не вызывали достоверного изменения пролиферации клеток линии В16 (Рис. 49 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.

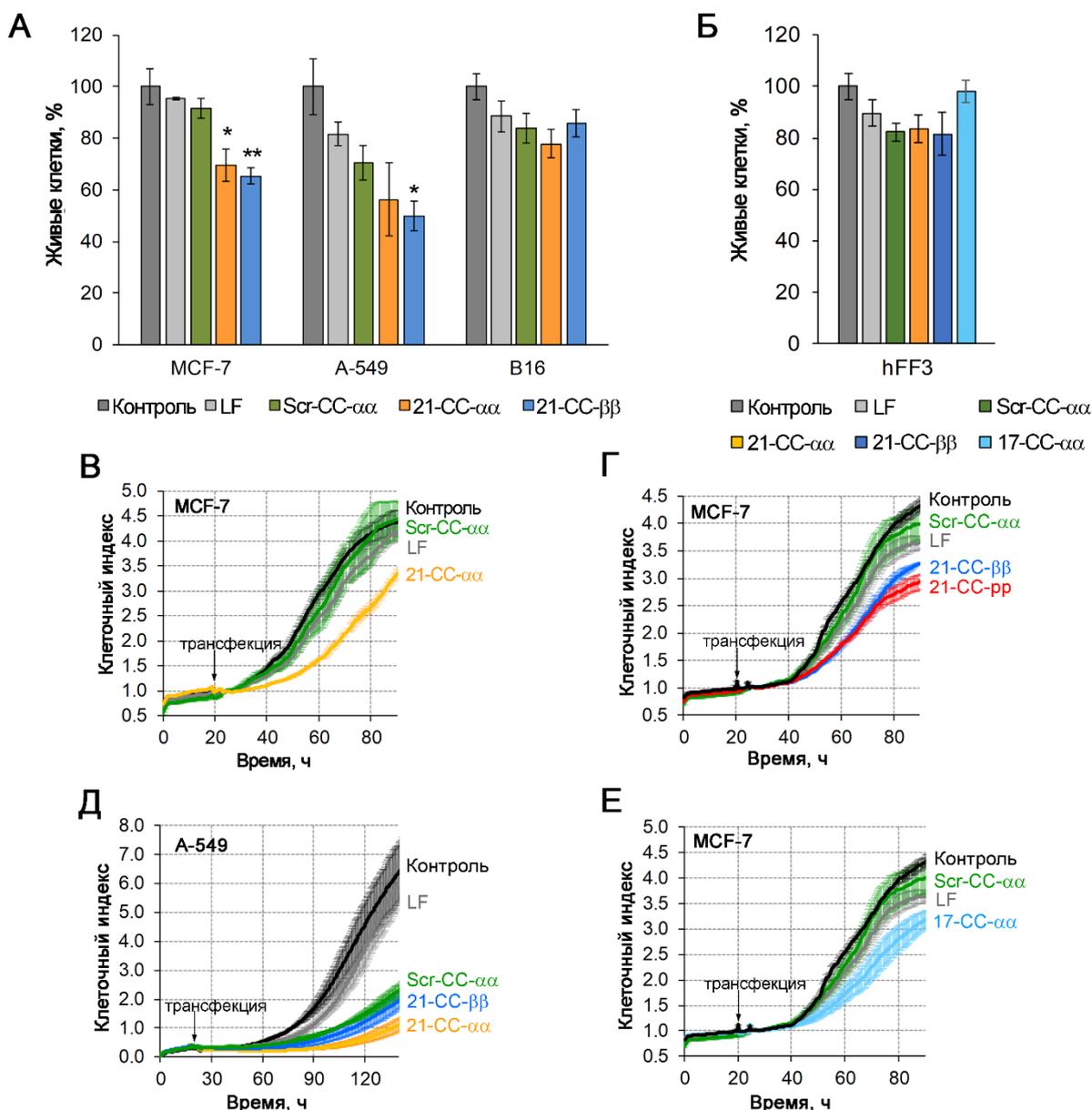


Рис. 49. Влияние крабоподобных миРНКаз на жизнеспособность опухолевых клеток. **А** – количество живых опухолевых клеток MCF-7, A549 и B16 после трансфекции миРНКазами 21-CC-αα и 21-CC-ββ. **Б** – жизнеспособность нормальных клеток фибробластов человека hFF3 после трансфекции миРНКазами 21-CC-αα, 21-CC-ββ и 17-CC-αα. WST-анализ проводили 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 А-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.

Трансфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine™ 2000 при концентрации соединений 1 мкМ. Контроль – интактные клетки. LF – клетки, инкубированные только с Lipofectamine™ 2000.

Исследование влияния крабоподобных миРНКаз на жизнеспособность нормальных клеток показало, что соединения не оказывают значимого эффекта на пролиферацию нетрансформированных клеток фибробластов человека линии hFF3 (Рис. 49 Б), что согласуется с литературными данными о селективности анти-миРНК-21 терапии по отношению к опухолевым клеткам [326].

Антипролиферативное действие крабоподобных миРНКаз в клетках MCF-7 и A549, 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- $\rho\rho$ вызывали замедление роста опухолевых клеток MCF-7 на 45–55 % (Рис. 49 В и Г). Антипролиферативное действие миРНКаз 21-CC- $\alpha\alpha$ и 21-CC- $\beta\beta$ на клетках A549 было ещё более выраженным: подавление клеточного роста достигало 85 % (Рис. 49 Д). Однако контрольный конъюгат Scr-CC- $\alpha\alpha$ также проявлял значимый антипролиферативный эффект на клетках A549 (Рис. 49 Д), что указывает на повышенную чувствительность этой линии клеток к воздействию. МиРНК-17-направленная миРНКазы Scrab- α -17 эффективно подавляла пролиферацию клеток MCF-7, снижая скорость клеточного роста на 40 % (Рис. 49 Е).

Результаты исследований подтверждают терапевтический потенциал крабоподобных миРНКаз в качестве селективных модуляторов онкогенных миРНК, 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 миРНК по действием 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- $\beta\rho$ 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- $\beta\rho$ в диапазоне концентраций 10-200 нМ (Рис. 50 А). 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. 50 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. 50 А).

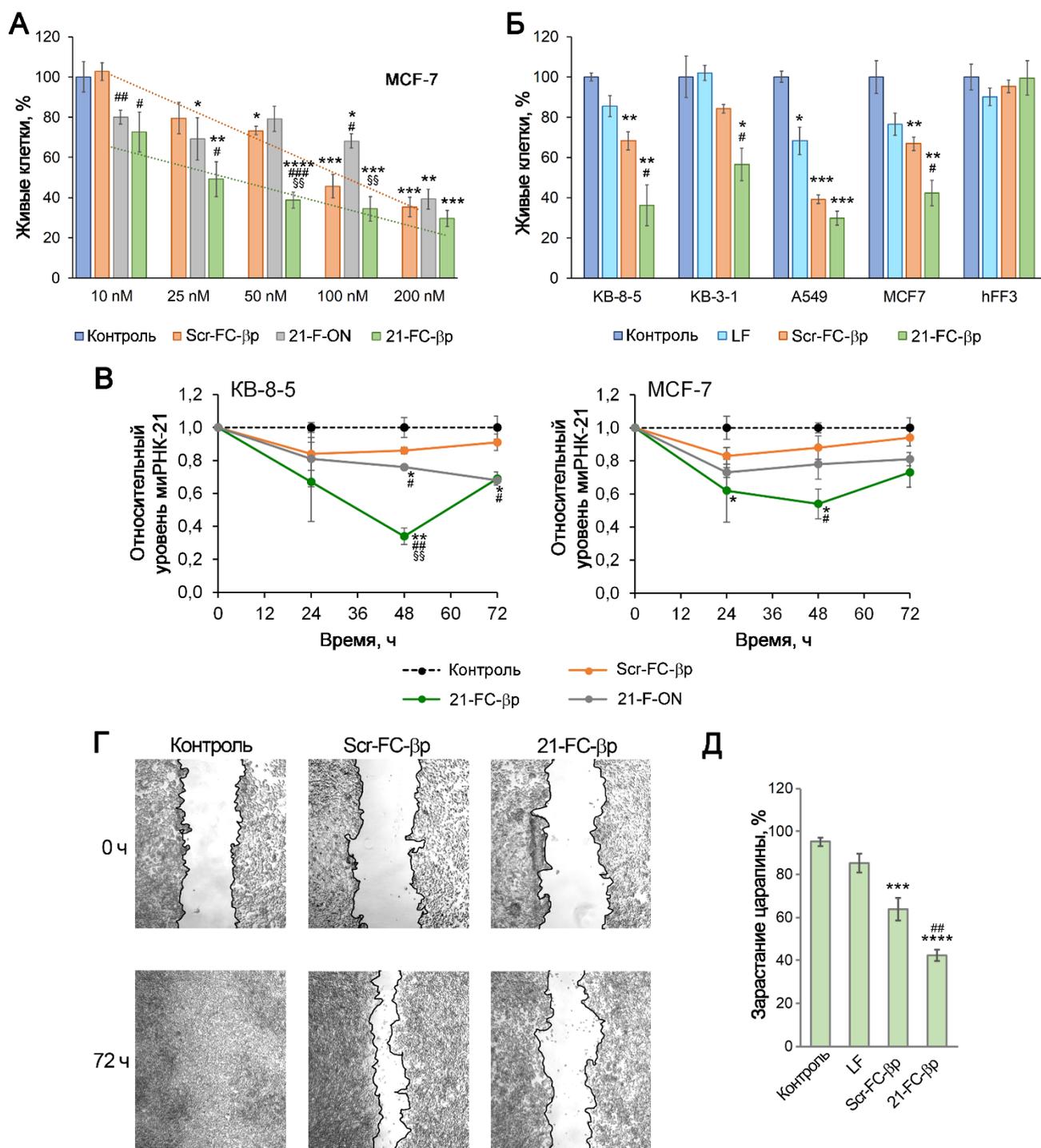


Рис. 50. Биологическая активность вилокподобных миРНКаз в опухолевых клетках. **А** – количество живых клеток MCF-7 после трансфекции миРНКазой 21-FC-βp и миРНК-21-направленным олигонуклеотидом 21-F-ON в различных концентрациях. МТТ-тест проводили через 72 ч после трансфекции миРНКазой/ON в диапазоне концентраций 10 – 200 нМ. **Б** – количество живых опухолевых клеток KB-8-5, KB-3-1, A549, MCF7 и нормальных фибробластов hFF3A при трансфекции 21-FC-βp. МТТ-тест проводили через 48 ч после трансфекции 21-FC-βp

в концентрации 50 нМ. В – кинетика снижения уровня миРНК-21 в клетках KB-8-5 и MCF-7 под действием миРНКазы 21-FC-βр в концентрации 50 нМ. Оценка уровней миРНК-21 проведена с помощью метода stem-loop ПЦР. Эффективность специфической миРНКазы определяли относительно интактных клеток (Контроль). Уровень миРНК 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 концентрации 50 нМ. Увеличение ×10. Черными линиями обозначены границы «царапины». Д – степень зарастания «царапины» через 72 ч после нанесения «царапины». Во всех экспериментах трансфекцию проводили с помощью Lipofectamine™ 2000. *, **, *** 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 вилокподобных миРНКаз, был проведён скрининг ряда культур, включая клетки эпидермоидной карциномы KB-8-5 и KB-3-1, меланомы В16, аденокарциномы лёгкого А549, 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 А549, составляющему 45–70%, при этом наибольшую чувствительность продемонстрировали линии KB-8-5, А549 и MCF-7 (Рис. 50 Б). Следует отметить, что клетки А549 проявляли значительную чувствительность и к действию контрольного конъюгата. При выраженном антипролиферативном действии на опухолевые клетки конъюгат 21-FC-βр не оказывал значимого влияния на жизнеспособность или пролиферацию нетрансформированных фибробластов hFF3, что свидетельствует о селективности его действия (Рис. 50 Б).

Методом ПЦР было подтверждено, что антипролиферативный эффект вилокподобной миРНКазы 21-FC-βр ассоциирован с подавлением экспрессии миРНК-21 (Рис. 50 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. 50 В). Для сравнения, миРНК-21-направленный олигонуклеотид 21-F-ON также вызывал подавление уровня миРНК-мишени, но с более низкой эффективностью, приводя к 35%-ному снижению уровня миРНК-21 (Рис. 50 В).

Известно, что миРНК-21 также играет ключевую роль в стимуляции процессов инвазии и миграции клеток, способствуя метастазированию и прогрессии неопластических заболеваний [289,327,328]. В рамках данного исследования были проанализированы антимиграционные свойства вилокподобной миРНКазы 21-FC-βр (Рис. 50 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 миРНКазы демонстрировала в 1.5–2 раза более выраженный ингибирующий эффект (Рис. 50 Г и Д). Полученные результаты согласуются с данными предшествующих исследований антимиграционной активности шпилечных миРНКаз на модели клеток KB-8-5 [329].

Проведенные исследования биологической активности показали, что разработанные крабоподобные и вилкоподобные миРНКазы обеспечивают эффективное и селективное подавление онкогенных миРНК, 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 миРНК, что сопровождалось антипролиферативным и антимиграционным эффектами.

Ингибирующие свойства разработанных миРНКаз сопоставимы или превосходят существующие технологии миРНК-направленной терапии. Так, миРНКазы не уступают по эффективности недавно разработанным химерным конструкциям, состоящим из миРНК-направленного антисмыслового олигонуклеотида, РНКазы L-рекрутирующего мотива и адресующего аптамера, которые снижали жизнеспособность клеток рака молочной железы на 33-50% [330]. Миграционная активность миРНКаз сопоставима по эффекту с действием РМО-анти-миРНК олигонуклеотидов, которые вызывают 45-65%-ное подавление клеточной мотильности на модели колоректального рака [331]. Кроме того, миРНКазы демонстрируют сопоставимые эффекты с коммерческими ингибиторами миРНК, например, продуктом компании GenePharma, способствующим подавлению пролиферации клеток рака поджелудочной железы на 50% [332].

Важной характеристикой миРНКаз является высокая селективность их действия: разработанные соединения эффективно подавляют экспрессию миРНК-мишеней (миРНК-21 и миРНК-17), не влияя на уровни других миРНК, 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 [326]. Так, экспрессия специфической анти-миРНК-21 лентивирусной конструкции в нормальных эпителиальных клетках молочной железы сопровождалась 60%-ным снижением миРНК при сохранении нормальных характеристик клеточного цикла, адгезии и чувствительности к радиотерапии, тогда как в опухолевых клетках MDA-MB-361 проявляла выраженные функциональные эффекты [326].

Несмотря на характерную для миРНК высокую внутриклеточную концентрацию и стабильность по сравнению с другими типами РНК [183,321], разработанные миРНКазы

демонстрируют способность к эффективному снижению уровней миРНК-мишеней при концентрациях, существенно уступающих средним физиологическим значениям, характерным для миРНК (0.5-22 мкМ). Высокая эффективность обусловлена способностью миРНКаз к многооборотному катализу и синергическому взаимодействию с эндогенной РНКазой H1.

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. Наряду с оценкой противоопухолевого эффекта дополнительной целью эксперимента являлось выявление возможной корреляции между рибонуклеазной активностью крабоподобных миРНКаз различной структуры, степенью подавления миРНК и противоопухолевым эффектом.

Для проведения исследования было выбрано две миРНКазы: 21-CC-pp, обладающая высокой каталитической активностью, и 21-CC-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-CC-aa. Анализ кинетики роста опухоли (Рис. 51 А и Б) показал, что 21-CC-pp проявляет наиболее выраженное ингибирующее действие, снижая объем опухоли на 85 % по сравнению с группой Scr-CC-aa. миРНКазы 21-CC-aa, обладающая более низкой каталитической активностью, также демонстрировала достоверное снижение роста опухоли, однако эффект был ниже и составлял 50 % по сравнению со Scr-CC-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.

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-CC-pp митотическая активность опухоли MCF-7 значительно снижалась,

приводя к трехкратному снижению численной плотности митозов по сравнению с группой Scr-CC- α (Рис. 51 В).

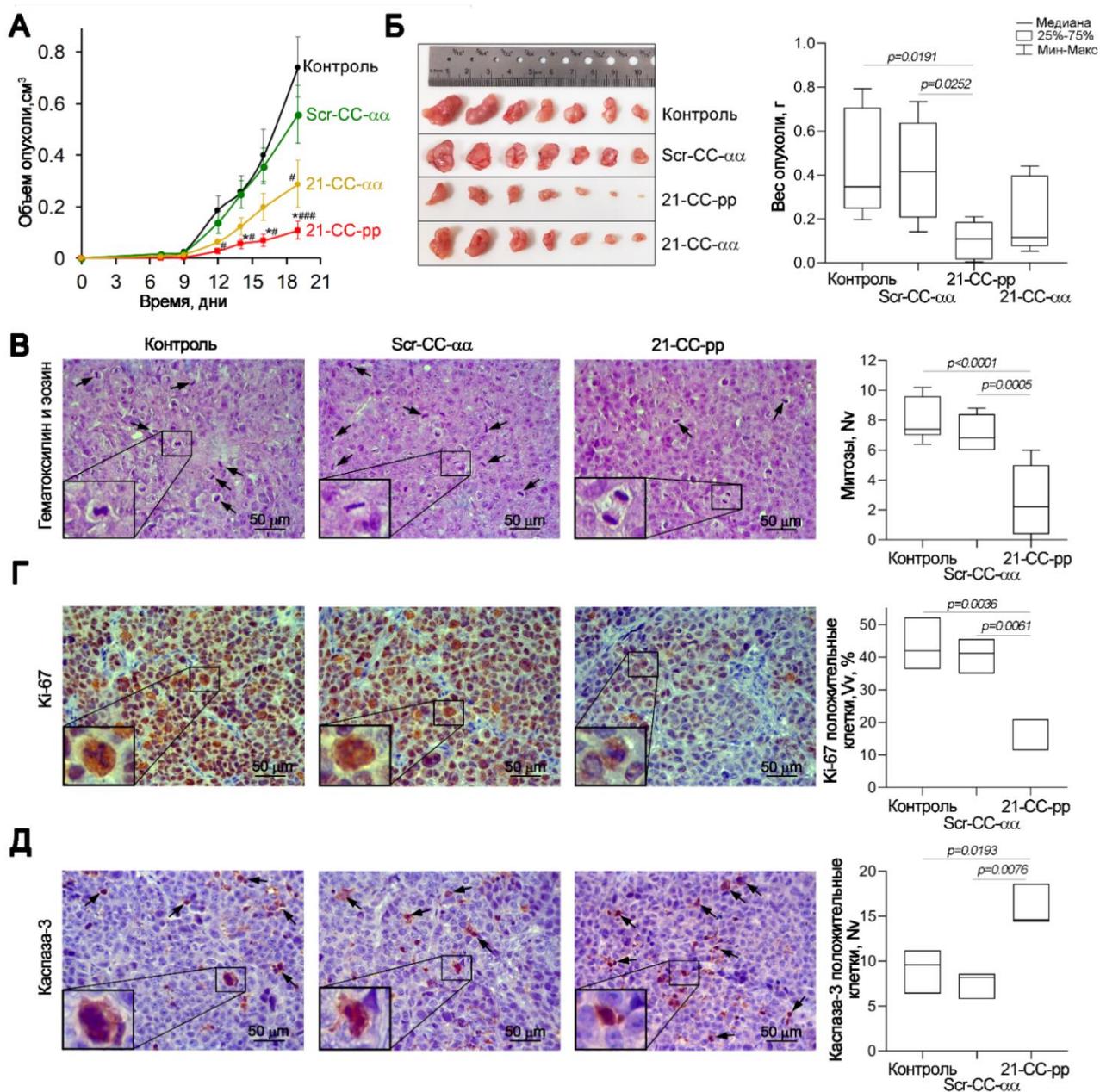


Рис. 51. Противоопухолевое действие миРНК-21-направленных крабоподобных миРНКаз на модели аденокарциномы молочной железы МСF-7. Клетки МСF-7 трансфицировали *in vitro* крабоподобными миРНКазами 21-СС-pp, 21-СС- α и контрольным конъюгатом Scr-CC- α в концентрации 1 мкМ с помощью Lipofectamine™ 2000, после чего клетки подкожно имплантировали мышам линии nude ($n = 7$). **А** – динамика роста опухоли МСF-7. Контроль – мыши с ксенотрансплантатами интактных клеток МСF-7. * – статистически значимые отличия от группы Scr-CC- α при $p \leq 0.05$. # и ### – статистически значимые отличия от группы контроля при $p \leq 0.05$ и $p \leq 0.001$, соответственно. **Б** – фотографии и масса первичных опухолей МСF-7 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. На правых панелях Г и Д приведена количественная оценка 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.

Литературные данные указывают на положительную корреляцию между экспрессией миРНК-21 и уровнем белка Ki-67, который является широко используемым маркером пролиферации [333]. Иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей MCF-7 с использованием Ki-67-специфичных антител показало, что в контрольной и Scr-CC- $\alpha\alpha$ группах приблизительно 40 % опухолевых клеток характеризовались положительной экспрессией данного маркера (Рис. 51 Г). В группе, обработанной миРНКазой 21-CC-pp, число Ki-67-положительных клеток снижалось до 12 %, что соответствует более чем трехкратному снижению пролиферативной активности опухолевых клеток *in vivo* (Рис. 51 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 [288]. Морфометрический анализ иммуногистохимических срезов, окрашенных специфическими антителами к каспазе-3, показал низкий уровень апоптотической активности в опухолевой ткани контрольной и Scr-CC- $\alpha\alpha$ групп (Рис. 51 Д). В группе, обработанной специфической миРНКазой 21-CC-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. 51 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- β r 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 [277].

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. 52, Рис. 53). Для

этого $Cu5.5-21-F-ON$ перитуморально вводили в опухоль KB-8-5 в концентрации 10 мкг/мышь с последующей оценкой биораспределения методом флуоресцентной визуализации *in vivo* в реальном времени.

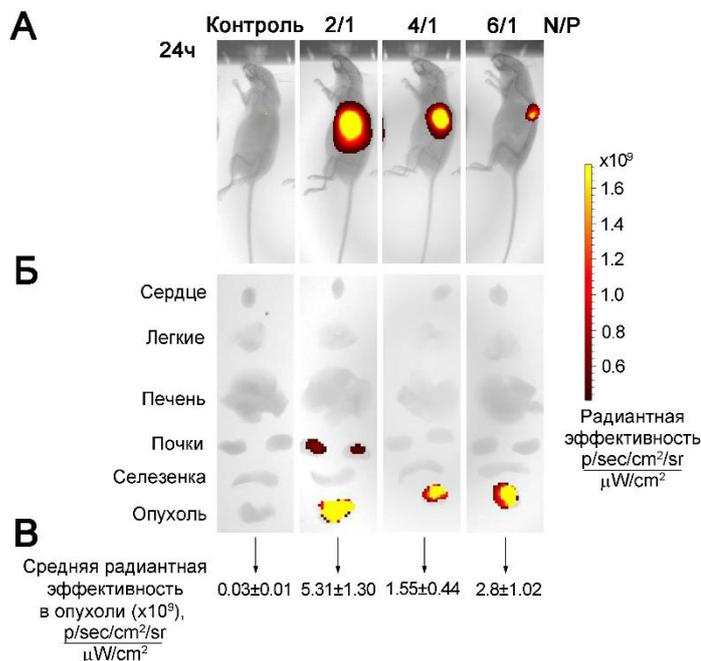


Рис. 52. Биораспределение $Cu5.5$ -меченого олигонуклеотида $Cu5.5-21-F-ON$ в мышах линии nude с опухолью KB-8-5 через 24 ч после инъекции. **А, Б** – демонстрационные изображения флуоресцентной визуализации в реальном времени мышей линии nude с опухолью KB-8-5 в боковой проекции (**А**) и извлеченных органов (**Б**) через 24 ч после перитуморального введения $Cu5.5-21-F-ON$ в комплексе с катионными липосомами F при соотношении N/P 2/1, 4/1 и 6/1. Контрoль – интактные мыши. (**В**) Средняя радиантная эффективность, измеренная в опухоли.

На первом этапе была проведена сравнительная оценка эффективности накопления $Cu5.5-21-F-ON$ в мышах-опухоленосителях при введении в комплексе с липосомами F при варьировании соотношения N/P: 2/1, 4/1 и 6/1 (Рис. 52). 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 животными, получавшими липоплексы, полученные при соотношениях N/P 4/1 и 6/1 (Рис. 52 В). Соотношение N/P 2/1 было использовано в дальнейших исследованиях для оценки кинетики накопления и выведения $Cu5.5-21-F-ON$ из опухолевой ткани (Рис. 53 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. 53 А и Б).

Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии криосрезов опухолевых узлов, подтвердил накопление $Cu5.5-21-F-ON$ в опухолевой ткани (Рис. 53 В).

Показано, что через 24 ч после введения, олигонуклеотид локализовался как в межклеточном пространстве, так и в цитоплазме опухолевых клеток.

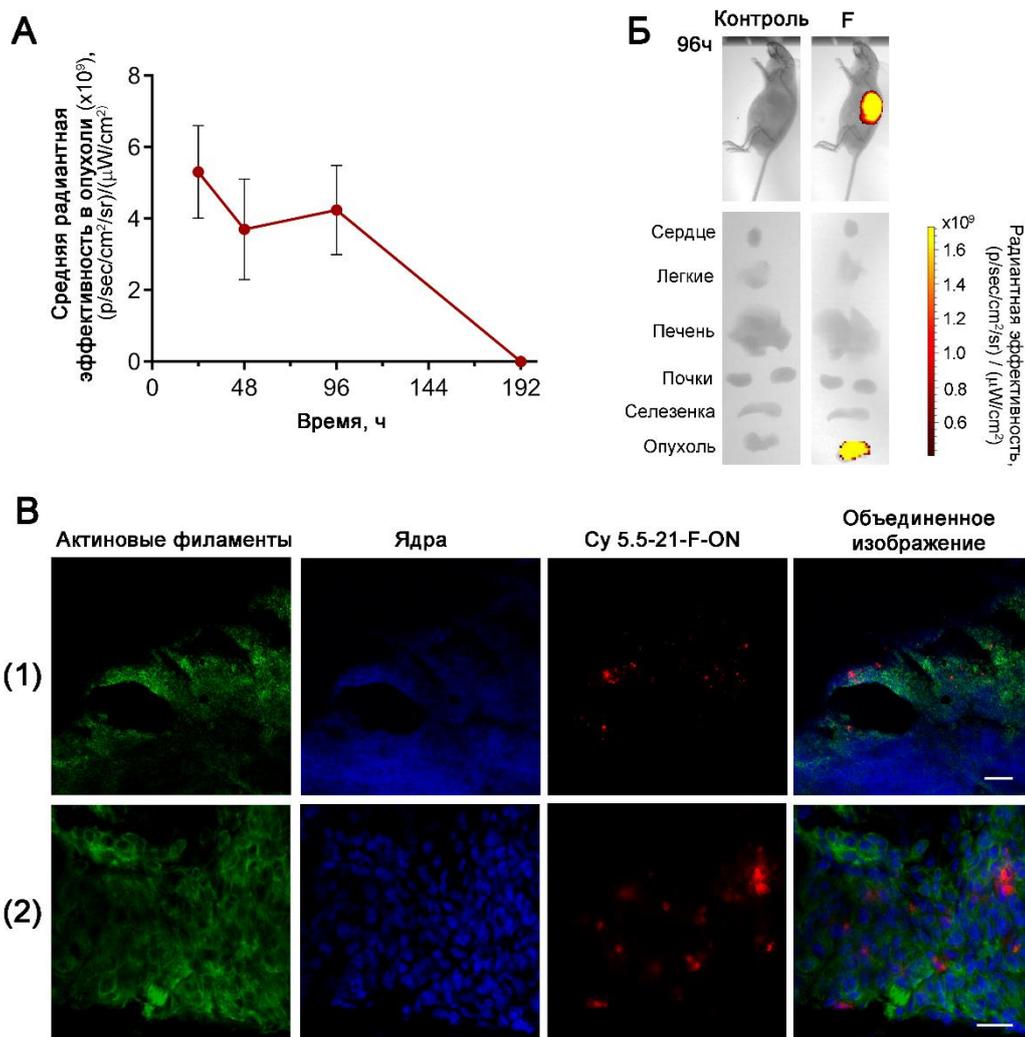


Рис. 53. Биораспределение Cy5.5-меченого олигонуклеотида Cy5.5-21-F-ON в мышах линии nude с опухолью KB-8-5. **А** – динамика относительной флуоресценции в опухоли KB-8-5 у мышей в течение 192 ч после перитуморального введения Cy5.5-21-F-ON в комплексе с фолат-содержащими катионными липосомами F. **Б** – 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 Cy5.5-21-F-ON в комплексе с липосомами F при соотношении N/P = 2/1. **В** – Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии криосрезов опухоли KB-8-5 через 24 ч после перитуморального введения Cy5.5-21-F-ON. Увеличение ×100, шкала соответствует масштабу 20 мкм (1), и увеличение ×630, шкала соответствует масштабу 100 мкм (2). Зеленый – окрашивание актиновых филаментов реагентом Phalloidin-iFluor 488; синий – окрашивание ядер DAPI, красный – визуализация Cy5.5-меченого олигонуклеотида.

На основании полученных экспериментальных данных был выбран протокол терапии, оптимальный для поддержания функциональной концентрации миРНК-21-ингибиторов в опухоли. С учётом устойчивости миРНКаз в сыворотке, кинетики подавления миРНК, а также эффективности накопления в опухоли, был установлен трехдневный интервал между

введениями, и на основании данных о динамике роста опухоли определена кратность введения – три перитуморальные инъекции миРНКаз.

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. 54 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. 54 А и Б).

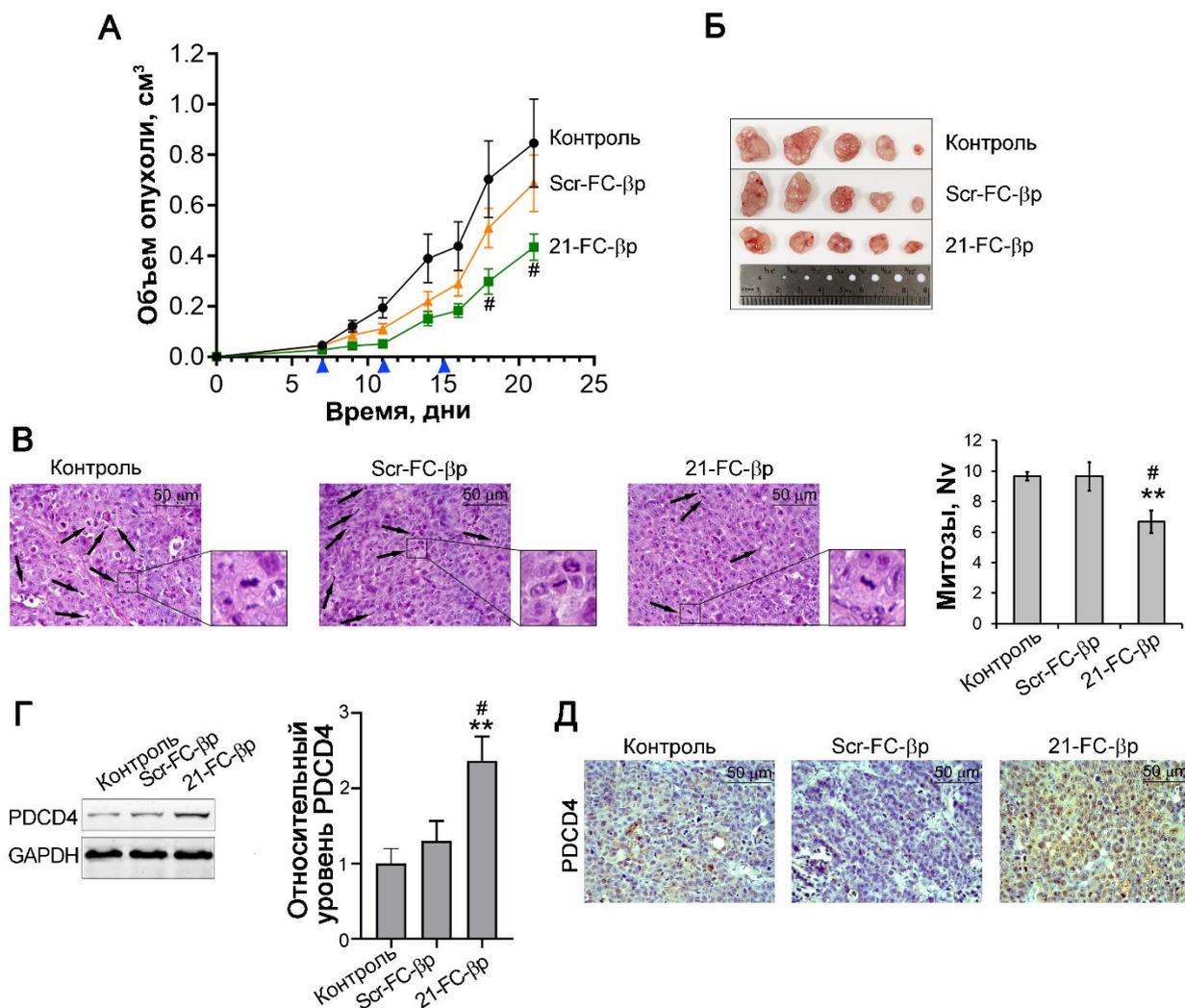


Рис. 54. Противоопухолевый эффект вилкоподобных миРНКаз. **А** – Кинетика роста опухоли KB-8-5 после перитуморальной инъекции 21-FC-βp и Scr-FC-βp в комплексе с липосомами F (N/P =2/1) мышам линии nude (n=5) в дозе 5 мкг/мышь. Дни инъекций отмечены синими стрелками. Контроль – мыши, получавшие инъекции 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 (столбчатая диаграмма справа). 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 анализа. 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. 54 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 21-FC-βр уровень PDCD4 в опухолевом лизате был повышен в 2.5 раза (Рис. 54 Г). Иммуногистохимическое окрашивание срезов ткани карциномы KB-8-5 с использованием специфических антител к PDCD4 подтвердило результаты Вестерн-блот анализа, что свидетельствует о специфичности проведённой терапии (Рис. 54 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. 55).

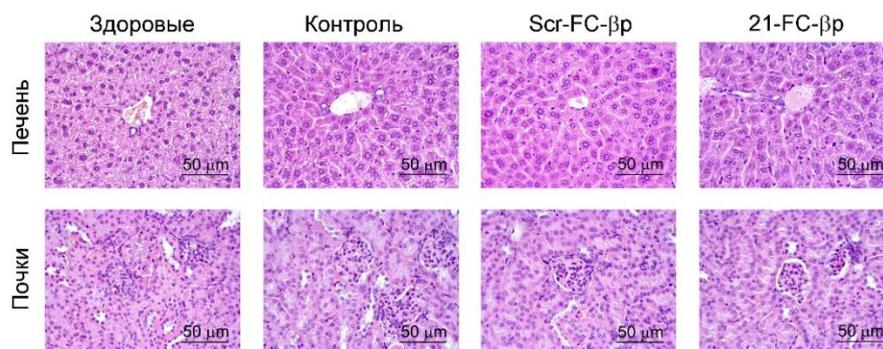


Рис. 55. Морфологические изменения в печени и почках здоровых мышей линии nude, мышей с карциномой KB-8-5 без введения миРНКаз (Контроль) и после терапии вилокподобными миРНКазами. Мыши получали три инъекции контрольного конъюгата Scr-FC-βр и анти-миРНК-21 миРНКазы 21-FC-βр в комплексе с липосомами F в дозе 5 мкг/мышь. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$.

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 H1, (3) высокой стабильностью в биологической среде и (4) выбором функционально

значимой миРНК-мишени – миРНК-21, которая является многофункциональным онкогеном и активно используется в качестве терапевтической мишени в доклинических исследованиях [288,334].

Исследование противоопухолевого потенциала крабоподобных миРНКаз проводили на модели *ex vivo*, аналогично ранее разработанным шпилечным миРНКазам [47], при этом наиболее активная крабоподобная миРНКаз 21-CC-pp обеспечивала 85%-ное снижение роста опухоли, что сопоставимо с результатами, полученными для шпилечных миРНКаз в экспериментах на модели лимфосаркомы RLS₄₀ у мышей. В то же время менее активная миРНКаз 21-CC-αα приводила к меньшему противоопухолевому эффекту (около 50%), что свидетельствует о наличии корреляции между рибонуклеазной активностью соединений, степенью подавления микроРНК-мишени и выраженностью терапевтического действия. Эти данные подтверждают ключевую роль каталитических свойств миРНКаз в обеспечении противоопухолевого эффекта. Важно отметить, что, согласно литературным данным, полученные результаты сопоставимы или превосходят эффективность ряда модифицированных олигонуклеотидов, содержащих PS, 2'-O-МОЕ, 2'-F или сEt модификации, которые обеспечивали 40–80%-ное ингибирование роста опухоли на моделях гепатоцеллюлярной карциномы *ex vivo* [335].

Вилкоподобные миРНКазы являются первыми миРНКазами, для которых исследован противоопухолевый потенциал при непосредственном введении разработанных ингибиторов животным. Трёхкратное перитуморальное введение миРНКазы 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 миРНКазы 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 миРНКаз в 1.5–2 раза ниже, чем при прямой трансфекции опухолевых клеток крабоподобными или шпилечными миРНКазами, 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 перспективных противоопухолевых терапевтических агентов. Использование более совершенных систем доставки и оптимизация терапевтических протоколов позволит разработать высокоэффективную стратегию лечения злокачественных заболеваний.

Заключение

Искусственные рибонуклеазы представляют собой перспективный класс многофункциональных молекулярных агентов, обеспечивающих селективное каталитическое разрушение РНК-мишеней. В отличие от классических АСО, иРНКазы обладают способностью к автономному каталитическому расщеплению целевой РНК и могут реализовывать инактивацию мишени посредством нескольких механизмов (Рис. 53).

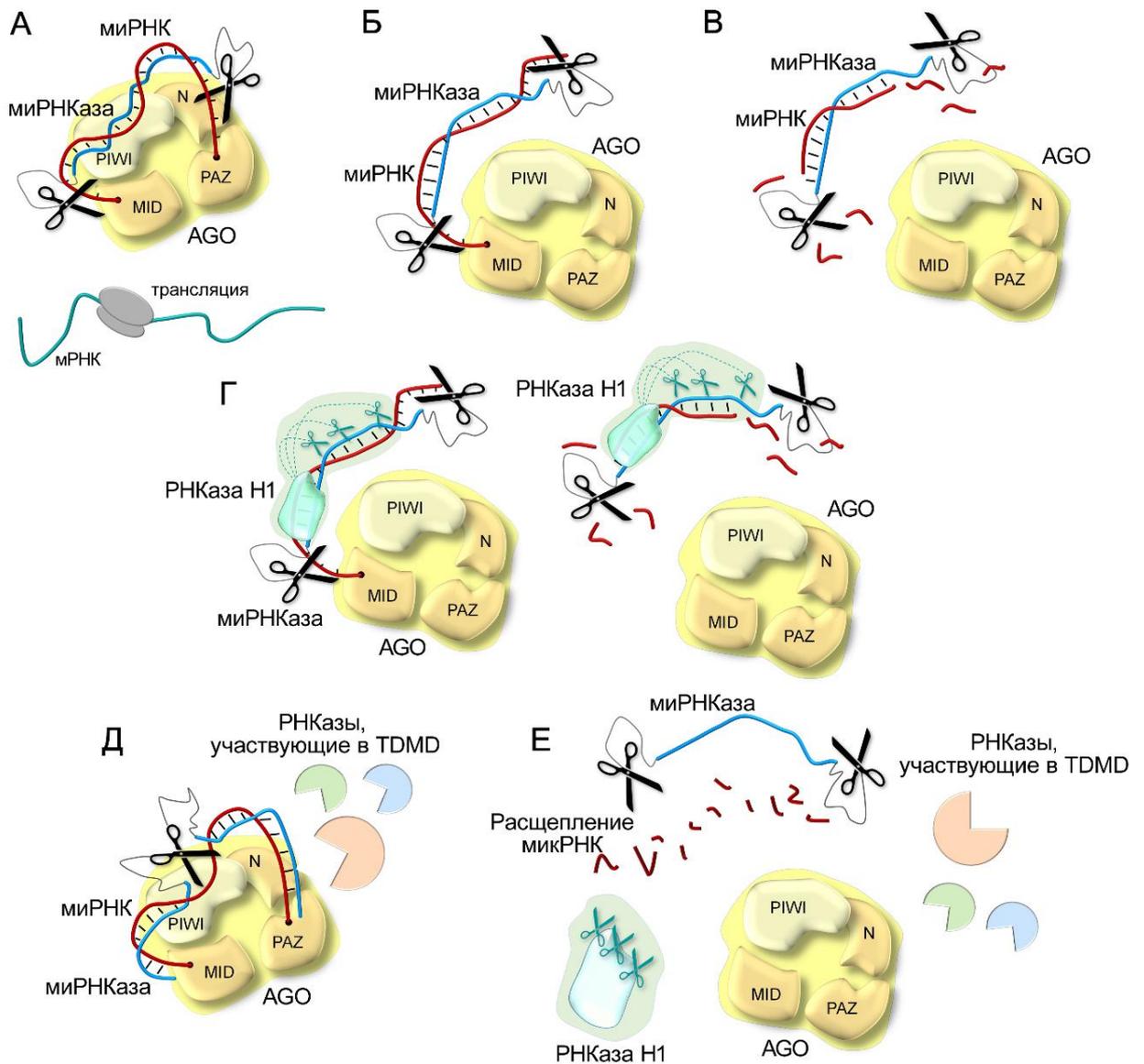


Рис. 53. Схематическое изображение возможных механизмов инактивации миРНК в клетке. А – стерическое блокирование миРНК за счёт комплементарного связывания с миРНКазой, в результате чего мРНК остается активной и транслируется в функциональный белок. Б – вытеснение миРНК из комплекса с АГО. В – сайт-специфическое расщепление миРНК под действием каталитических пептидов миРНКаз. Г – синергическая деградация миРНК при совместном действии миРНКазы и РНКазы Н1, приводящая к ускорению скорости расщепления РНК. Д – активация внутриклеточного пути деградации миРНК TDMD с дополнительным рекрутированием других внутриклеточных нуклеаз. Е – деградация миРНК-мишени по всем функциональным областям за счет комбинированного механизма действия, сочетающего в себе

прямую каталитическую активность миРНКаз и вовлечение внутриклеточных рибонуклеаз. миРНК обозначена красной линией, миРНКазы – синей. Ножницы – каталитические пептиды.

Иницирующим этапом ингибирующего действия миРНКазы является прямое физическое блокирование мишени, при котором миРНКазы, подобно АСО, комплементарно связывается с миРНК, препятствуя ее функционированию (Рис. 53 А). Наряду с этим комплементарное связывание может сопровождаться вытеснением миРНК из комплекса RISC (Рис. 53 Б). Основным же механизмом действия миРНКаз является прямое расщепление миРНК-мишеней посредством их каталитических доменов (Рис. 53 В). Эта автономность существенно расширяет возможности молекулярного конструирования таких соединений и позволяет свободно вводить химические модификации в олигонуклеотидную часть с целью повышения стабильности и оптимизации внутриклеточной доставки без потери каталитической функции. Данное свойство имеет важное значение в условиях отсутствия РНКазы Н1, в частности при подавлении онкогенных циркулирующих миРНК в биологических жидкостях при патологиях. Одновременно с этим при использовании в составе миРНКаз олигонуклеотидов, способных рекрутировать РНКазу Н1, становится возможным потенцировать её действие за счёт синергического взаимодействия с внутриклеточным ферментом, значительно ускоряя скорость деградации РНК-мишени (Рис. 53 Г). Кроме того, имитируя природные взаимодействия, миРНКазы потенциально способны запускать естественный внутриклеточный путь деградации миРНК TDMD, индуцируя вовлечение эндогенных нуклеаз и тем самым усиливая разрушение патологически активных миРНК (Рис. 53 Д).

Таким образом, мультифункциональный характер действия миРНКаз, включающий физическое блокирование миРНК, ее вытеснение из RISC-комплекса, прямое каталитическое расщепление, разрушение с привлечением РНКазы Н1 и активацию эндогенных путей деградации миРНК (Рис. 53 Е), обеспечивает их высокую миРНК-ингибирующую активность и принципиально отличает данный класс соединений от классических стерических ингибиторов. Особое значение каталитическая деградация миРНК приобретает в терапевтическом контексте, где требуется высокая селективность и эффективность при минимальной токсической нагрузке, поскольку деградация миРНК, в отличие от стерического блокирования, способствует обороту комплекса RISC и сохранению его функциональной активности. В случаях, когда терапевтическая задача требует более значительное подавление миРНК, миРНКазы могут быть сконструированы с возможностью рекрутирования РНКазы Н1, обеспечивая необратимое расщепление мишени, увеличение оборотов реакции и, как следствие, повышение терапевтической эффективности. Гибкость молекулярной структуры миРНКаз позволяет адаптировать механизм их действия под конкретные биологические и клинические задачи.

Сочетание высокой селективности, многоуровневого механизма действия, низкой дозовой нагрузки и развития современных средств доставки делает миРНКазы перспективным инструментом терапии заболеваний, ассоциированных с нарушением уровня миРНК.

Выводы

1. Разработано четыре серии миРНКаз на основе конъюгатов адресующего олигонуклеотида с пептидом (LRLRG)₂: двойные (DC), петлеобразующие (BC), крабоподобные (CC) и вилкоподобные (FC), различающиеся структурой адресующего домена, количеством и способом присоединения каталитических пептидов и их позиционированием относительно функциональных доменов миРНК-мишени. Показано, что эффективность комплексообразования миРНКаз с мишенью определяется структурой олигонуклеотидного домена: миРНКазы с прерывистыми гетеродуплексами, формирующие 5-нуклеотидный гэп (DC) или 3-нуклеотидную петлю (BC), достигают эффективного связывания при введении 2-аминоаденинов и/или увеличении суммарной длины гетеродуплекса до 17-20 нуклеотидов, тогда как миРНКазы с непрерывными гетеродуплексами (CC и FC) обеспечивают высокую аффинность при длине комплементарного участка 13-14 нуклеотидов.

2. Анализ рибонуклеазной активности миРНКаз различной структуры показал:

- миРНКазы с концевым расположением каталитических пептидов (CC и FC) расщепляют миРНК на 1-2 порядка эффективнее, чем конструкции с внутренним расположением пептидов (BC и DC);
- наиболее активные структурные варианты миРНКаз (CC и FC) функционируют в многооборотном режиме;
- введение в структуру второго каталитического пептида (CC и BC) увеличивает рибонуклеазную активность миРНКаз;
- конъюгирование пептида посредством аминоксильного линкера к 5'- и 3'-фосфату олигонуклеотида обеспечивает более высокую рибонуклеазную активность конъюгата, чем присоединение к С1'-положению дезоксирибозы;
- наличие в последовательности миРНК С-А и U-А связей в области, доступной для каталитической атаки пептидов, увеличивает скорость расщепления мишени.

3. Установлено синергическое взаимодействие разработанных миРНКаз с РНКазой H1, приводящее к расщеплению миРНК-мишени по всем функциональным доменам:

- для миРНКаз, формирующих пространственно разделенные сайты связывания с РНКазой H1 (DC и моно-пептидных BC), наблюдается максимальное увеличение скорости расщепления миРНК – до 120 раз, однако количественная деградация мишени не достигается даже за 72 ч;
- для миРНКаз с собственной высокой рибонуклеазной активностью (CC, FC и бис-пептидные BC) наблюдается наибольшая скорость расщепления, обеспечивающая количественное разрушение мишени за 8-24 ч.

4. МиРНКазы с высокой каталитической активностью (CC и FC), направленные к миРНК-21 и миРНК-17, обеспечивают селективное снижение уровней миРНК-мишеней в опухолевых клетках

МСF-7 и KB-8-5, что приводит к подавлению пролиферативной и миграционной активностей клеток, а также ингибированию роста опухолей у мышей *ex vivo* и *in vivo* на 50-85%. Установлена прямая корреляция между рибонуклеазной активностью миРНКаз, степенью подавления онкогенных миРНК в опухолевых клетках *in vitro* и уровнем торможения роста опухоли *in vivo*.

Список литературы

1. Fu M., Gu J., Wang M., Zhang J., Chen Y., Jiang P., Zhu T., Zhang X. 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., Hong X., Gao Y., Kho A.T., Tantisira K.G., Li J. piRNA associates with immune diseases // *Cell Commun. Signal*. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 347.
5. Chen S., Ben S., Xin J., Li S., Zheng R., Wang H., Fan L., Du M., Zhang Z., Wang M. 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., Amaral P.P., Carninci P., Carpenter S., Chang H.Y., Chen L.-L., Chen R., Dean C., Dinger M.E., Fitzgerald K.A., Gingeras T.R., Guttman M., Hirose T., Huarte M., Johnson R., Kanduri C., Kapranov P., Lawrence J.B., Lee J.T. 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*. – 2020. – Vol. 8. – P. 409.
10. Bofill-De Ros X., Vang Ørom U.A. Recent progress in miRNA biogenesis and decay // *RNA Biol*. – 2024. – Vol. 21. – № 1. – P. 1–8.
11. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. 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*. – 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*. – 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*. – 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., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. // *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., Young D.D., Xiong X., Hogenesch J.B., Huang Q., Deiters A. Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2008. – Vol. 47. – № 39. – P. 7482–7484.
20. Chang H., Yi B., Ma R., Zhang X., Zhao H., Xi Y. 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., Meng X., Pan J., Jiang N., Zhou C., Wu Z., Gong Z. CRISPR/Cas9-mediated noncoding RNA editing in human cancers // *RNA Biol.* – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 35–43.
22. Hussen B.M., Rasul M.F., Abdullah S.R., Hidayat H.J., Faraj G.S.H., Ali F.A., Salihi A., Baniahmad A., Ghafouri-Fard S., Rahman M., Glassy M.C., Branicki W., Taheri M. 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., Gaponova (Miroshnichenko) S.K., Sen'kova A. V., Savin I.A., Gladkikh D. V., Burakova E.A., Fokina A.A., Maslov M.A., Shmendel' E. V., Wood M.J.A., Vlassov V. V., Altman S., Stetsenko D.A., Zenkova M.A. Methyl 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., Patutina O., Sen'kova A., Burakova E., Savin I., Markov A., Shmendel E., Maslov M., Stetsenko D., Vlassov V., Zenkova M. Single shot vs. cocktail: a comparison of mono- and combinative application of miRNA-targeted methyl 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., Li F., Wang W., Wang X., Li S., Liu J. 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., Kuwahara H., Daizo K., Watari A., Kondoh M., Yoshida-Tanaka K., Kaburagi H., Asada K., Nagata T., Nagahama M., Yagi K., Yokota T. 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., Cerqueira L., Figueiredo C., Oliveira C., Azevedo N.F. Anti-miRNA oligonucleotides: A comprehensive guide for design // *RNA Biol.* – 2018. – Vol. 15. – № 3. – P. 338–352.
32. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V. V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Methyl 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., Zhang T.-T., Zhou N., Wu C.Y., Lin M.-H., Liu Y.-J. miRNA-10b sponge: An anti-breast cancer study in vitro // *Oncol. Rep.* – 2016. – Vol. 35. – № 4. – P. 1950–1958.
36. Gao S., Tian H., Guo Y., Li Y., Guo Z., Zhu X., Chen X. 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., Sun X., Wang M., Hou Y., Zhan Y., Jiang Y., Liu Z., Cao X., Chen P., Liu Z., Chen X., Tao Y., Xu C., Mao J., Cheng C., Li C., Hu Y., Wang L., Chin Y.E. 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., Saint-Germain E., Benoit A., Bourdeau V., Moro A., Ferbeyre G. 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., Liu D., Wang Y., Wu Q., Wu T., Fang R. Generation of MiRNA sponge constructs targeting multiple MiRNAs. // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2022. – Vol. 36. – № 7. – P. e24527.
40. Meng L., Liu C., Lü J., Zhao Q., Deng S., Wang G., Qiao J., Zhang C., Zhen L., Lu Y., Li W., Zhang Y., Pestell R.G., Fan H., Chen Y.H., Liu Z., Yu Z. Small RNA zippers lock miRNA molecules and block miRNA function in mammalian cells // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8. – P. 13964.
41. Danneberg F., Ghidini A., Dogandzhiyski P., Kalden E., Strömberg R., Göbel M.W. 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., Thomas L., Scheffer U., Hartmann R.K., Göbel M.W. 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., Schmauk N., Murmann N., Böhm M., Schwenger A., Göbel M.W. Quality control of mRNA vaccines by synthetic ribonucleases: analysis of the Poly-A-Tail // *ChemBioChem.* – 2024. – Vol. 25. – № 13.
44. Gaglione M., Milano G., Chambery A., Moggio L., Romanelli A., Messere A. PNA-based artificial nucleases as antisense and anti-miRNA oligonucleotide agents // *Mol. Biosyst.* – 2011. – Vol. 7. – № 8. – P. 2490.
45. Patutina O.A., Bichenkova E. V., Miroshnichenko S.K., Mironova N.L., Trivoluzzi L.T., Burusco K.K., Bryce R.A., Vlassov V. V., Zenkova M.A. miRNases: Novel peptide-oligonucleotide bioconjugates that silence miR-21 in lymphosarcoma cells // *Biomaterials.* – 2017. – Vol. 122. – P. 163–178.
46. Patutina O.A., Bazhenov M.A., Miroshnichenko S.K., Mironova N.L., Pyshnyi D. V., Vlassov V. V., Zenkova M.A. 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., Miroshnichenko S.K., Mironova N.L., Sen'kova A. V., Bichenkova E. V., Clarke D.J., Vlassov V. V., Zenkova M.A. Catalytic knockdown of miR-21 by artificial Ribonuclease: Biological performance in tumor model // *Front. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1–13.
48. Conn V.M., Chinnaiyan A.M., Conn S.J. Circular RNA in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2024. – Vol. 24. – № 9. – P. 597–613.
49. Goodall G.J., Wickramasinghe V.O. RNA in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 22–36.
50. Li Y., Sun S. RNA dysregulation in neurodegenerative diseases // *EMBO J.* – 2025. – Vol. 44. – № 3. – P. 613–638.

51. Sessa F., Salerno M., Esposito M., Cocimano G., Pomara C. miRNA dysregulation in cardiovascular diseases: current opinion and future perspectives // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 5192.
52. Kumar D., Sahoo S.S., Chauss D., Kazemian M., Afzali B. Non-coding RNAs in immunoregulation and autoimmunity: Technological advances and critical limitations // *J. Autoimmun.* – 2023. – Vol. 134. – P. 102982.
53. Han Y., Zhang G., Lv X., Ren L. Critical role of cellular microRNAs in virus infection: Decades of progress // *Anim. Zoonoses.* – 2025.
54. Bhatti G.K., Khullar N., Sidhu I.S., Navik U.S., Reddy A.P., Reddy P.H., Bhatti J.S. Emerging role of non-coding RNA in health and disease // *Metab. Brain Dis.* – 2021. – Vol. 36. – № 6. – P. 1119–1134.
55. Jarrous N., Liu F. Human RNase P: overview of a ribonuclease of interrelated molecular networks and gene-targeting systems // *RNA.* – 2023. – Vol. 29. – № 3. – P. 300–307.
56. Hyjek M., Figiel M., Nowotny M. RNases H: Structure and mechanism // *DNA Repair (Amst).* – 2019. – Vol. 84. – P. 102672.
57. Naeem S., Zhang J., Zhang Y., Wang Y. Nucleic acid therapeutics: Past, present, and future // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* – 2025. – Vol. 36. – № 1. – P. 102440.
58. Teng M., Xia Z.J., Lo N., Daud K., He H.H. Assembling the RNA therapeutics toolbox // *Med. Rev.* – 2024. – Vol. 4. – № 2. – P. 110–128.
59. Liang X., Shen W., Sun H., Migawa M.T., Vickers T.A., Crooke S.T. Translation efficiency of mRNAs is increased by antisense oligonucleotides targeting upstream open reading frames // *Nat. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 34. – № 8. – P. 875–880.
60. Sasaki S., Sun R., Bui H.-H., Crosby J.R., Monia B.P., Guo S. Steric inhibition of 5' UTR regulatory elements results in upregulation of human CFTR // *Mol. Ther.* – 2019. – Vol. 27. – № 10. – P. 1749–1757.
61. Jin S., Zhan J., Zhou Y. Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity // *Mol. Biol. Rep.* – 2021. – Vol. 48. – № 5. – P. 4837–4849.
62. Zhang K., Li Y., Huang Y., Sun K. PiRNA in cardiovascular disease: Focus on cardiac remodeling and cardiac protection // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* – 2023. – Vol. 16. – № 4. – P. 768–777.
63. Deng X., Liao T., Xie J., Kang D., He Y., Sun Y., Wang Z., Jiang Y., Miao X., Yan Y., Tang H., Zhu L., Zou Y., Liu P. The burgeoning importance of PIWI-interacting RNAs in cancer progression // *Sci. China Life Sci.* – 2024. – Vol. 67. – № 4. – P. 653–662.
64. Wu Z., Yu X., Zhang S., He Y., Guo W. Novel roles of PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in human health and diseases // *Cell Commun. Signal.* – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P.

- 343.
65. Aravin A., Gaidatzis D., Pfeffer S., Lagos-Quintana M., Landgraf P., Iovino N., Morris P., Brownstein M.J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Chien M., Russo J.J., Ju J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M., Tuschl T. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes // *Nature*. – 2006. – Vol. 442. – № 7099. – P. 203–207.
 66. Girard A., Sachidanandam R., Hannon G.J., Carmell M.A. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins // *Nature*. – 2006. – Vol. 442. – № 7099. – P. 199–202.
 67. Kumar P., Anaya J., Mudunuri S.B., Dutta A. Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets // *BMC Biol.* – 2014. – Vol. 12. – № 1. – P. 78.
 68. Liu Y., Li C., Cui X., Li M., Liu S., Wang Z. Potentially diagnostic and prognostic roles of piRNAs/PIWIs in pancreatic cancer: A review // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. – 2025. – Vol. 1880. – № 2. – P. 189286.
 69. Loubalova Z., Konstantinidou P., Haase A.D. Themes and variations on piRNA-guided transposon control // *Mob. DNA*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 10.
 70. Egli M., Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – Vol. 51. – № 6. – P. 2529–2573.
 71. Stein H., Hausen P. Enzyme from calf thymus degrading the RNA moiety of DNA-RNA hybrids: effect on DNA-dependent RNA polymerase // *Science (80-.)*. – 1969. – Vol. 166. – № 3903. – P. 393–395.
 72. Malik H.S. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses // *Genome Res.* – 2001. – Vol. 11. – № 7. – P. 1187–1197.
 73. Lee H., Cho H., Kim J., Lee S., Yoo J., Park D., Lee G. RNase H is an exo- and endoribonuclease with asymmetric directionality, depending on the binding mode to the structural variants of RNA:DNA hybrids // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – № 4. – P. 1801–1814.
 74. Pizzi S., Sertic S., Orcesi S., Cereda C., Bianchi M., Jackson A.P., Lazzaro F., Plevani P., Muzi-Falconi M. Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi–Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability // *Hum. Mol. Genet.* – 2015. – Vol. 24. – № 3. – P. 649–658.
 75. Cerritelli S.M., Frolova E.G., Feng C., Grinberg A., Love P.E., Crouch R.J. Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. // *Mol. Cell*. – 2003. – Vol. 11. – № 3. – P. 807–815.
 76. Crow Y.J., Leitch A., Hayward B.E., Garner A., Parmar R., Griffith E., Ali M., Semple C.,

- Aicardi J., Babul-Hirji R., Baumann C., Baxter P., Bertini E., Chandler K.E., Chitayat D., Cau D., Déry C., Fazzi E., Goizet C. et al. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38. – № 8. – P. 910–916.
77. Crow Y.J., Chase D.S., Lowenstein Schmidt J., Szykiewicz M., Forte G.M.A., Gornall H.L., Oojageer A., Anderson B., Pizzino A., Helman G., Abdel-Hamid M.S., Abdel-Salam G.M., Ackroyd S., Aeby A., Agosta G., Albin C., Allon-Shalev S., Arellano M., Ariaudo G. et al. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1 // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2015. – Vol. 167. – № 2. – P. 296–312.
78. Pendergraft W.F., Means T.K. AGS, SLE, and RNASEH2 mutations: translating insights into therapeutic advances // *J. Clin. Invest.* – 2015. – Vol. 125. – № 1. – P. 102–104.
79. Günther C., Kind B., Reijns M.A.M., Berndt N., Martinez-Bueno M., Wolf C., Tüngler V., Chara O., Lee Y.A., Hübner N., Bicknell L., Blum S., Krug C., Schmidt F., Kretschmer S., Koss S., Astell K.R., Ramantani G., Bauerfeind A. et al. Defective removal of ribonucleotides from DNA promotes systemic autoimmunity // *J. Clin. Invest.* – 2015. – Vol. 125. – № 1. – P. 413–424.
80. Aden K., Bartsch K., Dahl J., Reijns M.A.M., Esser D., Sheibani-Tezerji R., Sinha A., Wottawa F., Ito G., Mishra N., Knittler K., Burkholder A., Welz L., van Es J., Tran F., Lipinski S., Kakavand N., Boeger C., Lucius R. et al. Epithelial RNase H2 maintains genome integrity and prevents intestinal tumorigenesis in mice // *Gastroenterology.* – 2019. – Vol. 156. – № 1. – P. 145–159.e19.
81. Hiller B., Hoppe A., Haase C., Hiller C., Schubert N., Müller W., Reijns M.A.M., Jackson A.P., Kunkel T.A., Wenzel J., Behrendt R., Roers A. Ribonucleotide excision repair is essential to prevent squamous cell carcinoma of the skin // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78. – № 20. – P. 5917–5926.
82. Cerritelli S.M., El Hage A. RNases H1 and H2: guardians of the stability of the nuclear genome when supply of dNTPs is limiting for DNA synthesis // *Curr. Genet.* – 2020. – Vol. 66. – № 6. – P. 1073–1084.
83. Lima W.F., Murray H.M., Damle S.S., Hart C.E., Hung G., De Hoyos C.L., Liang X.-H., Crooke S.T. Viable RNaseH1 knockout mice show RNaseH1 is essential for R loop processing, mitochondrial and liver function // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – № 11. – P. 5299–5312.
84. Liang X.-H., Sun H., Nichols J.G., Crooke S.T. RNase H1-dependent antisense oligonucleotides are robustly active in directing RNA cleavage in both the cytoplasm and the nucleus // *Mol.*

- Ther. – 2017. – Vol. 25. – № 9. – P. 2075–2092.
85. Shen W., Sun H., De Hoyos C.L., Bailey J.K., Liang X., Crooke S.T. Dynamic nucleoplasmic and nucleolar localization of mammalian RNase H1 in response to RNAP I transcriptional R-loops // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45. – № 18. – P. 10672–10692.
 86. Cerritelli S.M., Crouch R.J. Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes // *FEBS Journal.* – 2009. – Vol. 276. – № 6. – P. 1494–1505.
 87. Holmes J.B., Akman G., Wood S.R., Sakhuja K., Cerritelli S.M., Moss C., Bowmaker M.R., Jacobs H.T., Crouch R.J., Holt I.J. Primer retention owing to the absence of RNase H1 is catastrophic for mitochondrial DNA replication // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2015. – Vol. 112. – № 30. – P. 9334–9339.
 88. Nowotny M., Cerritelli S.M., Ghirlando R., Gaidamakov S.A., Crouch R.J., Yang W. Specific recognition of RNA/DNA hybrid and enhancement of human RNase H1 activity by HBD // *EMBO J.* – 2008. – Vol. 27. – № 7. – P. 1172–1181.
 89. Davis R.R., Shaban N.M., Perrino F.W., Hollis T. Crystal structure of RNA-DNA duplex provides insight into conformational changes induced by RNase H binding // *Cell Cycle.* – 2015. – Vol. 14. – № 4. – P. 668–673.
 90. Crooke S.T., Liang X.-H., Baker B.F., Crooke R.M. Antisense technology: A review // *J. Biol. Chem.* – 2021. – Vol. 296. – P. 100416.
 91. Crooke S.T., Liang X., Crooke R.M., Baker B.F., Geary R.S. Antisense drug discovery and development technology considered in a pharmacological context // *Biochem. Pharmacol.* – 2020. – P. 114196.
 92. Pang J., Guo Q., Lu Z. The catalytic mechanism, metal dependence, substrate specificity, and biodiversity of ribonuclease H // *Front. Microbiol.* – 2022. – Vol. 13.
 93. Samara N.L., Yang W. Cation trafficking propels RNA hydrolysis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 25. – № 8. – P. 715–721.
 94. Wu H., Lima W.F., Crooke S.T. Investigating the structure of human RNase H1 by site-directed mutagenesis // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – № 26. – P. 23547–23553.
 95. Goedken E.R., Marqusee S. Co-crystal of Escherichia coli RNase HI with Mn 2+ ions reveals two divalent metals bound in the active site // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – № 10. – P. 7266–7271.
 96. Nowotny M., Yang W. Stepwise analyses of metal ions in RNase H catalysis from substrate destabilization to product release // *EMBO J.* – 2006. – Vol. 25. – № 9. – P. 1924–1933.
 97. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloro-ethylamine and nitrogen mustard residues. // *Tetrahedron Lett.* – 1967. – Vol. 8. – № 37. – P. 3557–3562.

98. Grineva N.I., Karpova G.G. Complementary addressed alkylation of ribosomal RNA with alkylating derivatives of oligonucleotides // *Mol. Biol.* – 1974. – Vol. 8. – № 6. – P. 832–844.
99. Grineva N.I., Karpova G.G., Kuznetsova L.M., Uimitova T.A., Venkstern T.B. Complementarily addressed alkylation of yeast tRNA 1 Val with chloroethylmethylaminobenzylidene d(pC-G)-A. Proof of the modification of the third nucleotide located at the 5'-terminus of the complete binding site of the reagent. // *Mol. Biol. (Mosk).* – 1976. – Vol. 10. – № 6. – P. 1260–1271.
100. Paterson B.M., Roberts B.E., Kuff E.L. Structural gene identification and mapping by DNA.mRNA hybrid-arrested cell-free translation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A*, – 1977. – Vol. 74. – № 10. – P. 4370–4374.
101. Sang A., Zhuo S., Bochanis A., Manautou J.E., Bahal R., Zhong X., Rasmussen T.P. Mechanisms of action of the US Food and Drug Administration-Approved antisense oligonucleotide drugs // *BioDrugs.* – 2024. – Vol. 38. – № 4. – P. 511–526.
102. Collotta D., Bertocchi I., Chiapello E., Collino M. Antisense oligonucleotides: a novel Frontier in pharmacological strategy // *Front. Pharmacol.* – 2023. – Vol. 14.
103. Liang X., Sun H., Shen W., Crooke S.T. Identification and characterization of intracellular proteins that bind oligonucleotides with phosphorothioate linkages // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43. – № 5. – P. 2927–2945.
104. Crooke S.T., Wang S., Vickers T.A., Shen W., Liang X. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – № 3. – P. 230–237.
105. Wu H., Sun H., Liang X., Lima W.F., Crooke S.T. Human RNase H1 is associated with protein P32 and is involved in mitochondrial pre-rRNA processing // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 8. – P. 1–15.
106. Zhang L., Bernardo K.D., Vickers T.A., Tian J., Liang X., Crooke S.T. 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.
107. Zamaratski E., Pradeepkumar P.I., Chattopadhyaya J. A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2001. – Vol. 48. – № 3. – P. 189–208.
108. Lima W.F., Nichols J.G., Wu H., Prakash T.P., Migawa M.T., Wyrzykiewicz T.K., Bhat B., Crooke S.T. Structural requirements at the catalytic site of the heteroduplex substrate for human RNase H1 catalysis // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – № 35. – P. 36317–36326.
109. Stein C.A., Subasinghe C., Shinozuka K., Cohen J.S. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – Vol. 16. – № 8. – P. 3209–3221.

110. Crooke S.T., Vickers T.A., Liang X. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – № 10. – P. 5235–5253.
111. Caruthers M.H., Beaton G., Cummins L., Dellinger D., Graff D., Ma Y.-X., Marshall W.S., Sasmor H., Shankland P., Van Wu J., Yau E.K. Chemical and biochemical studies with dithioate DNA // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1991. – Vol. 10. – № 1–3. – P. 47–59.
112. Cummins L., Graff D., Beaton G., Marshall W.S., Caruthers M.H. Biochemical and physicochemical properties of phosphorodithioate DNA // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35. – № 26. – P. 8734–8741.
113. Sergueev D.S., Shaw B.R. H -Phosphonate approach for solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates and their characterization // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – Vol. 120. – № 37. – P. 9417–9427.
114. Sato K., Nukaga Y., Wada T. Solid-phase synthesis and properties of stereocontrolled boranophosphate/phosphate and phosphorothioate/phosphate chimeric oligouridylates // *R. Soc. Open Sci.* – 2023. – Vol. 10. – № 4.
115. Takahashi Y., Sato K., Wada T. Solid-phase synthesis of Boranophosphate/Phosphorothioate/Phosphate chimeric oligonucleotides and their potential as antisense oligonucleotides // *J. Org. Chem.* – 2022. – Vol. 87. – № 6. – P. 3895–3909.
116. Sheehan D., Lunstad B., Yamada C.M., Stell B.G., Caruthers M.H., Dellinger D.J. Biochemical properties of phosphonoacetate and thiophosphonoacetate oligodeoxyribonucleotides. // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31. – № 14. – P. 4109–4118.
117. Šípová H., Špringer T., Rejman D., Šimák O., Petrová M., Novák P., Rosenbergová Š., Páv O., Liboska R., Barvík I., Štěpánek J., Rosenberg I., Homola J. 5'-O-Methylphosphonate nucleic acids—new modified DNAs that increase the Escherichia coli RNase H cleavage rate of hybrid duplexes // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – № 8. – P. 5378–5389.
118. Yamada C.M., Dellinger D.J., Caruthers M.H. Synthesis and biochemical evaluation of phosphonoformate oligodeoxyribonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – № 15. – P. 5251–5261.
119. Anderson B.A., Freestone G.C., Low A., De-Hoyos C.L., III W.J.D., Østergaard M.E., Migawa M.T., Fazio M., Wan W.B., Berdeja A., Scandalis E., Burel S.A., Vickers T.A., Crooke S.T., Swayze E.E., Liang X., Seth P.P. Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49. – № 16. – P. 9026–9041.
120. Stetsenko D.A. Mesyl Phosphoramidate oligonucleotides: a new promising type of antisense agents // *Handbook of Chemical Biology of Nucleic Acids.* Singapore, – 2023. – P. 543–583.

121. Zhang L., Liang X., De Hoyos C.L., Migawa M., Nichols J.G., Freestone G., Tian J., Seth P.P., Crooke S.T. The combination of Methyl-phosphoramidate inter-nucleotide linkages and 2'-O-Methyl in selected positions in the antisense oligonucleotide enhances the performance of RNaseH1 active PS-ASOs // *Nucleic Acid Ther.* – 2022. – Vol. 32. – № 5. – P. 401–411.
122. Perry C.M., Barman Balfour J.A. Fomivirsen // *Drugs.* – 1999. – Vol. 57. – № 3. – P. 375–380.
123. Noronha A.M., Wilds C.J., Lok C.-N., Viazovkina K., Arion D., Parniak M.A., Damha M.J. Synthesis and biophysical properties of Arabinonucleic Acids (ANA): circular dichroic spectra, melting temperatures, and ribonuclease H susceptibility of ANA·RNA hybrid duplexes // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – № 24. – P. 7050–7062.
124. Damha M.J., Wilds C.J., Noronha A., Brukner I., Borkow G., Arion D., Parniak M.A. Hybrids of RNA and Arabinonucleic Acids (ANA and 2'F-ANA) Are Substrates of Ribonuclease H // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – Vol. 120. – № 51. – P. 13545–13545.
125. Kalota A., Karabon L., Swider C.R., Viazovkina E., Elzagheid M., Damha M.J., Gewirtz A.M. 2'-Deoxy-2'-fluoro- -D-arabinonucleic acid (2'F-ANA) modified oligonucleotides (ON) effect highly efficient, and persistent, gene silencing // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34. – № 2. – P. 451–461.
126. Takahashi M., Li H., Zhou J., Chomchan P., Aishwarya V., Damha M.J., Rossi J.J. Dual mechanisms of action of self-delivering, anti-HIV-1 FANA oligonucleotides as a potential new approach to HIV therapy // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* – 2019. – Vol. 17. – P. 615–625.
127. Pelisch N., Rosas Almanza J., Stehlik K.E., Aperi B. V., Kroner A. Use of a self-delivering Anti-CCL3 FANA oligonucleotide as an innovative approach to target inflammation after spinal cord injury // *eneuro.* – 2021. – Vol. 8. – № 2. – P. ENEURO.0338-20.2021.
128. Chorzalska A., Morgan J., Ahsan N., Treaba D.O., Olszewski A.J., Petersen M., Kingston N., Cheng Y., Lombardo K., Schorl C., Yu X., Zini R., Pacilli A., Tepper A., Coburn J., Hryniewicz-Jankowska A., Zhao T.C., Oancea E., Reagan J.L. et al. Bone marrow-specific loss of ABI1 induces myeloproliferative neoplasm with features resembling human myelofibrosis // *Blood.* – 2018. – Vol. 132. – № 19. – P. 2053–2066.
129. Akimova T., Wang L., Bartosh Z., Christensen L.M., Eruslanov E., Singhal S., Aishwarya V., Hancock W.W. Antisense targeting of FOXP3+ Tregs to boost anti-tumor immunity // *Front. Immunol.* – 2024. – Vol. 15.
130. Li F., Sarkhel S., Wilds C.J., Wawrzak Z., Prakash T.P., Manoharan M., Egli M. 2'-Fluoroarabino- and Arabinonucleic Acid show different conformations, resulting in deviating RNA affinities and processing of their heteroduplexes with RNA by RNase H // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45. – № 13. – P. 4141–4152.
131. Danielsen M.B., Lou C., Lisowiec-Wachnicka J., Pasternak A., Jørgensen P.T., Wengel J.

- Gapmer antisense oligonucleotides containing 2',3'-Dideoxy-2'-fluoro-3'-C-hydroxymethyl- β -d-lyxofuranosyl nucleotides display site-specific RNase H cleavage and induce gene silencing // *Chem. - A Eur. J.* – 2020. – Vol. 26. – № 6. – P. 1368–1379.
132. Istrate A., Katolik A., Istrate A., Leumann C.J. 2' β -fluoro-tricyclo nucleic acids (2'F-tc-ANA): thermal duplex stability, structural studies, and RNase H activation // *Chem. – A Eur. J.* – 2017. – Vol. 23. – № 43. – P. 10310–10318.
133. Frei S., Istrate A., Leumann C.J. 6'-Fluoro[4.3.0]bicyclo nucleic acid: synthesis, biophysical properties and molecular dynamics simulations // *Beilstein J. Org. Chem.* – 2018. – Vol. 14. – P. 3088–3097.
134. Frei S., Katolik A.K., Leumann C.J. Synthesis, biophysical properties, and RNase H activity of 6'-difluoro[4.3.0]bicyclo-DNA // *Beilstein J. Org. Chem.* – 2019. – Vol. 15. – P. 79–88.
135. Katsuzaki Y., Tsukimura R., Chandela A., Chano T., Ueno Y. 4'- C -aminoethoxy-modified DNAs exhibit increased nuclease resistance, sustained RNase H activity, and inhibition of KRAS gene expression // *Chem. Biodivers.* – 2022. – Vol. 19. – № 8.
136. Onishi S., Chandela A., Ueno Y. Synthesis and evaluation of 4'- C -(S) and 4'- C -(R)-2-aminopropoxy–thymidine-modified DNAs for thermal stability, RNase H digestion, and nuclease resistance // *ChemistrySelect.* – 2024. – Vol. 9. – № 23.
137. Wang J., Verbeure B., Luyten I., Lescrinier E., Froeyen M., Hendrix C., Rosemeyer H., Seela F., Van Aerschot A., Herdewijn P. Cyclohexene nucleic acids (CeNA): Serum stable oligonucleotides that activate RNase H and increase duplex stability with complementary RNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 122. – № 36. – P. 8595–8602.
138. Verbeure B. RNase H mediated cleavage of RNA by cyclohexene nucleic acid (CeNA) // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – № 24. – P. 4941–4947.
139. Pontarelli A., Wilds C.J. Oligonucleotides containing C5-propynyl modified Arabinonucleic Acids: synthesis, biophysical and antisense properties // *ChemBioChem.* – 2023. – Vol. 24. – № 9.
140. Souleimanian N., Deleavey G.F., Soifer H., Wang S., Tiemann K., Damha M.J., Stein C.A. Antisense 2'-Deoxy, 2'-Fluoroarabino Nucleic Acid (2'F-ANA) Oligonucleotides: In Vitro Gymnotic Silencers of Gene Expression Whose Potency Is Enhanced by Fatty Acids // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* – 2012. – Vol. 1. – P. e43.
141. Le B.T., Chen S., Abramov M., Herdewijn P., Veedu R.N. Evaluation of anhydrohexitol nucleic acid, cyclohexenyl nucleic acid and d-altritol nucleic acid-modified 2'-O-methyl RNA mixmer antisense oligonucleotides for exon skipping in vitro. // *Chem. Commun.* – 2016. – Vol. 52. – № 92. – P. 13467–13470.
142. Sergeeva O., Akhmetova E., Dukova S., Beloglazkina E., Uspenskaya A., Machulkin A.,

- Stetsenko D., Zatspein T. Structure-activity relationship study of mesyl and busyl phosphoramidate antisense oligonucleotides for unaided and PSMA-mediated uptake into prostate cancer cells // *Front. Chem.* – 2024. – Vol. 12.
143. Astaneh B., Makhdami N., Astaneh V., Guyatt G. The Effect of Mipomersen in the Management of Patients with Familial Hypercholesterolemia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* – 2021. – Vol. 8. – № 7. – P. 82.
144. Gales L. Tegsedi (Inotersen): An Antisense Oligonucleotide Approved for the Treatment of Adult Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis // *Pharmaceuticals.* – 2019. – Vol. 12. – № 2. – P. 78.
145. Paik J., Duggan S. Volanesorsen: First Global Approval // *Drugs.* – 2019. – Vol. 79. – № 12. – P. 1349–1354.
146. Nie T. Eplontersen: First Approval // *Drugs.* – 2024. – Vol. 84. – № 4. – P. 473–478.
147. Meyer T., Schumann P., Weydt P., Petri S., Koc Y., Spittel S., Bernsen S., Günther R., Weishaupt J.H., Dreger M., Kolzarek F., Kettemann D., Norden J., Boentert M., Vidovic M., Meisel C., Münch C., Maier A., Körtvélyessy P. Neurofilament light-chain response during therapy with antisense oligonucleotide tofersen in SOD1-related ALS: Treatment experience in clinical practice. // *Muscle Nerve.* – 2023. – Vol. 67. – № 6. – P. 515–521.
148. Syed Y.Y. Olezarsen: First Approval // *Drugs.* – 2025. – Vol. 85. – № 4. – P. 571–576.
149. Laxton C., Brady K., Moschos S., Turnpenny P., Rawal J., Pryde D.C., Sidders B., Corbau R., Pickford C., Murray E.J. Selection, Optimization, and Pharmacokinetic Properties of a Novel, Potent Antiviral Locked Nucleic Acid-Based Antisense Oligomer Targeting Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55. – № 7. – P. 3105–3114.
150. Chery J., Petri A., Wagschal A., Lim S.-Y., Cunningham J., Vasudevan S., Kauppinen S., Näär A.M. Development of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides Targeting Ebola Viral Proteins and Host Factor Niemann-Pick C1 // *Nucleic Acid Ther.* – 2018. – Vol. 28. – № 5. – P. 273–284.
151. Sadewasser A., Dietzel E., Michel S., Klüver M., Helfer M., Thelemann T., Klar R., Eickmann M., Becker S., Jaschinski F. Anti-Niemann Pick C1 Single-Stranded Oligonucleotides with Locked Nucleic Acids Potently Reduce Ebola Virus Infection In Vitro // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* – 2019. – Vol. 16. – P. 686–697.
152. Okamoto S., Echigoya Y., Tago A., Segawa T., Sato Y., Itou T. Antiviral Efficacy of RNase H-Dependent Gapmer Antisense Oligonucleotides against Japanese Encephalitis Virus // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 19. – P. 14846.
153. Lulla V., Wandel M.P., Bandyra K.J., Ulferts R., Wu M., Dendooven T., Yang X., Doyle N.,

- Oerum S., Beale R., O'Rourke S.M., Randow F., Maier H.J., Scott W., Ding Y., Firth A.E., Bloznelyte K., Luisi B.F. Targeting the Conserved Stem Loop 2 Motif in the SARS-CoV-2 Genome // *J. Virol.* – 2021. – Vol. 95. – № 14.
154. Qiao Y., Wotring J.W., Zhang C.J., Jiang X., Xiao L., Watt A., Gattis D., Scandalis E., Freier S., Zheng Y., Pretto C.D., Ellison S.J., Swayze E.E., Guo S., Sexton J.Z., Chinnaiyan A.M. Antisense oligonucleotides to therapeutically target SARS-CoV-2 infection // *PLoS One.* – 2023. – Vol. 18. – № 2. – P. e0281281.
155. Yamasaki M., Saso W., Yamamoto T., Sato M., Takagi H., Hasegawa T., Kozakura Y., Yokoi H., Ohashi H., Tsuchimoto K., Hashimoto R., Fukushi S., Uda A., Muramatsu M., Takayama K., Maeda K., Takahashi Y., Nagase T., Watashi K. Anti-SARS-CoV-2 gapmer antisense oligonucleotides targeting the main protease region of viral RNA // *Antiviral Res.* – 2024. – Vol. 230. – P. 105992.
156. Zhu C., Lee J.Y., Woo J.Z., Xu L., Nguyenla X., Yamashiro L.H., Ji F., Biering S.B., Van Dis E., Gonzalez F., Fox D., Wehri E., Rustagi A., Pinsky B.A., Schaletzky J., Blish C.A., Chiu C., Harris E., Sadreyev R.I. et al. An intranasal ASO therapeutic targeting SARS-CoV-2 // *Nat. Commun.* – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 4503.
157. Morelli E., Biamonte L., Federico C., Amodio N., Di Martino M.T., Gallo Cantafio M.E., Manzoni M., Scionti F., Samur M.K., Gullà A., Stamato M.A., Pitari M.R., Caracciolo D., Sesti S., Frandsen N.M., Rossi M., Neri A., Fulciniti M., Munshi N.C. et al. Therapeutic vulnerability of multiple myeloma to MIR17PTi, a first-in-class inhibitor of pri-miR-17-92 // *Blood.* – 2018. – Vol. 132. – № 10. – P. 1050–1063.
158. Morelli E., Fulciniti M., Samur M.K., Ribeiro C.F., Wert-Lamas L., Henninger J.E., Gullà A., Aktas-Samur A., Todoerti K., Talluri S., Park W.D., Federico C., Scionti F., Amodio N., Bianchi G., Johnstone M., Liu N., Gramegna D., Maisano D. et al. A MIR17HG-derived long noncoding RNA provides an essential chromatin scaffold for protein interaction and myeloma growth // *Blood.* – 2023. – Vol. 141. – № 4. – P. 391–405.
159. Løvendorf M.B., Holm A., Petri A., Thruue C.A., Uchida S., Venø M.T., Kauppinen S. Knockdown of Circular RNAs Using LNA-Modified Antisense Oligonucleotides // *Nucleic Acid Ther.* – 2023. – Vol. 33. – № 1. – P. 45–57.
160. Berhane T., Holm A., Karstensen K.T., Petri A., Ilieva M.S., Krarup H., Vyberg M., Løvendorf M.B., Kauppinen S. Knockdown of the long noncoding RNA PURPL induces apoptosis and sensitizes liver cancer cells to doxorubicin // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 19502.
161. Li C., Sun C., Mahapatra K. Das, Riihilä P., Knuutila J., Nissinen L., Lapins J., Kähäri V.-M., Homey B., Sonkoly E., Pivarski A. Long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation 1 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and exon 2 is critical for its

- oncogenicity // *Br. J. Dermatol.* – 2024. – Vol. 190. – № 3. – P. 415–426.
162. Amodio N., Stamato M.A., Juli G., Morelli E., Fulciniti M., Manzoni M., Taiana E., Agnelli L., Cantafio M.E.G., Romeo E., Raimondi L., Caracciolo D., Zuccalà V., Rossi M., Neri A., Munshi N.C., Tagliaferri P., Tassone P. Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmer ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity // *Leukemia.* – 2018. – Vol. 32. – № 9. – P. 1948–1957.
163. Adewunmi O., Shen Y., Zhang X.H.-F., Rosen J.M. Targeted Inhibition of lncRNA Malat1 Alters the Tumor Immune Microenvironment in Preclinical Syngeneic Mouse Models of Triple-Negative Breast Cancer // *Cancer Immunol. Res.* – 2023. – Vol. 11. – № 11. – P. 1462–1479.
164. Bothwell A.L., Altman S. Partial purification and properties of an endoribonuclease isolated from human KB cells. // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250. – № 4. – P. 1451–1459.
165. Koski R.A., Bothwell A.L.M., Altman S. Identification of a ribonuclease P-like activity from human KB cells // *Cell.* – 1976. – Vol. 9. – № 1. – P. 101–116.
166. Forster A.C., Altman S. External Guide Sequences for an RNA Enzyme // *Science (80-.)*. – 1990. – Vol. 249. – № 4970. – P. 783–786.
167. Yuan Y., Altman S. Selection of Guide Sequences That Direct Efficient Cleavage of mRNA by Human Ribonuclease P // *Science (80-.)*. – 1994. – Vol. 263. – № 5151. – P. 1269–1273.
168. Altman S. Antibiotics present and future // *FEBS Lett.* – 2014. – Vol. 588. – № 1. – P. 1–2.
169. Kirsebom L.A., Liu F., McClain W.H. The discovery of a catalytic RNA within RNase P and its legacy // *J. Biol. Chem.* – 2024. – Vol. 300. – № 6. – P. 107318.
170. Danilin N.A., Matveev A.L., Tikunova N. V., Venyaminova A.G., Novopashina D.S. Conjugates of RNase P-Guiding Oligonucleotides with Oligo(N-Methylpyrrole) as Prospective Antibacterial Agents // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2021. – Vol. 47. – № 2. – P. 469–477.
171. Deng Q., Liu Y., Li X., Yan B., Sun X., Tang W., Trang P., Yang Z., Gong H., Wang Y., Lu J., Chen J., Xia C., Xing X., Lu S., Liu F. Inhibition of human cytomegalovirus major capsid protein expression and replication by ribonuclease P-associated external guide sequences // *RNA.* – 2019. – Vol. 25. – № 5. – P. 645–655.
172. Yan B., Liu Y., Chen Y.-C., Liu F. External Guide Sequence Effectively Suppresses the Gene Expression and Replication of Herpes Simplex Virus 2 // *Molecules.* – 2024. – Vol. 29. – № 9. – P. 2052.
173. Liu Y., Yan B., Zhang I., Liu F. RNase P-Associated External Guide Sequences Inhibit HIV-1 Infection by Shutting Down Human CCR5 Expression // *Receptors.* – 2025. – Vol. 4. – № 1. – P. 3.
174. Höck J., Meister G. The Argonaute protein family // *Genome Biol.* – 2008. – Vol. 9. – № 2. – P. 210.

175. Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles // *Nat. Rev. Genet.* – 2013. – Vol. 14. – № 7. – P. 447–459.
176. Nakanishi K. Anatomy of four human Argonaute proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – № 12. – P. 6618–6638.
177. Quévillon Huberdeau M., Zeitler D.M., Hauptmann J., Bruckmann A., Fressigné L., Danner J., Piquet S., Strieder N., Engelmann J.C., Jannot G., Deutzmann R., Simard M.J., Meister G. Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for microRNA-guided gene silencing in vivo // *EMBO J.* – 2017. – Vol. 36. – № 14. – P. 2088–2106.
178. Mohamed A.A., Wang P.Y., Bartel D.P., Vos S.M. The structural basis for RNA slicing by human Argonaute2 // *Cell Rep.* – 2025. – Vol. 44. – № 1. – P. 115166.
179. Miyazaki Y., Du X., Muramatsu S., Gomez C.M. An miRNA-mediated therapy for SCA6 blocks IRES-driven translation of the CACNA1A second cistron // *Sci. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 8. – № 347.
180. Becker W.R., Ober-Reynolds B., Jouravleva K., Jolly S.M., Zamore P.D., Greenleaf W.J. High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2 // *Mol. Cell.* – 2019. – Vol. 75. – № 4. – P. 741–755.e11.
181. Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J. Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC // *Cell.* – 2018. – Vol. 173. – № 4. – P. 946–957.
182. Xiao Y., Macrae I.J. Robust differential microRNA targeting driven by supplementary interactions in vitro // *RNA.* – 2020. – Vol. 26. – № 2. – P. 162–174.
183. Bartel D.P. Metazoan MicroRNAs // *Cell.* – 2018. – Vol. 173. – № 1. – P. 20–51.
184. Pawlica P., Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J., Steitz J.A. 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.
185. Willkomm S., Jakob L., Kramm K., Graus V., Neumeier J., Meister G., Grohmann D. Single-molecule FRET uncovers hidden conformations and dynamics of human Argonaute 2 // *Nat. Commun.* – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 3825.
186. Anzelon T.A., Chowdhury S., Hughes S.M., Xiao Y., Lander G.C., MacRae I.J. Structural basis for piRNA targeting // *Nature.* – 2021. – Vol. 597. – № 7875. – P. 285–289.
187. Schwarz D.S., Tomari Y., Zamore P.D. The RNA-Induced Silencing Complex Is a Mg²⁺-Dependent Endonuclease // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14. – № 9. – P. 787–791.
188. Liu J., Carmell M.A., Rivas F. V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.-J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., Hannon G.J. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi // *Science* (80-.). – 2004. – Vol. 305. – № 5689. – P. 1437–1441.
189. Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. Human

- Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs // *Mol. Cell.* – 2004. – Vol. 15. – № 2. – P. 185–197.
190. Park M.S., Phan H.-D., Busch F., Hinckley S.H., Brackbill J.A., Wysocki V.H., Nakanishi K. Human Argonaute3 has slicer activity // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45. – № 20. – P. 11867–11877.
191. Park M.S., Sim G., Kehling A.C., Nakanishi K. Human Argonaute2 and Argonaute3 are catalytically activated by different lengths of guide RNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2020. – Vol. 117. – № 46. – P. 28576–28578.
192. Hauptmann J., Dueck A., Harlander S., Pfaff J., Merkl R., Meister G. Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 20. – № 7. – P. 814–817.
193. Faehnle C.R., Elkayam E., Haase A.D., Hannon G.J., Joshua-Tor L. The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1 // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 3. – № 6. – P. 1901–1909.
194. Wang B., Li S., Qi H.H., Chowdhury D., Shi Y., Novina C.D. Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 16. – № 12. – P. 1259–1266.
195. Pong S.K., Gullerova M. Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes - Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins // *FEBS Lett.* – 2018. – Vol. 592. – № 17. – P. 2973–2986.
196. Wu J., Yang J., Cho W.C., Zheng Y. Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles // *J. Adv. Res.* – 2020. – Vol. 24. – P. 317–324.
197. Wang J., Li Y. Current advances in antiviral RNA interference in mammals // *FEBS J.* – 2024. – Vol. 291. – № 2. – P. 208–216.
198. Ding S.-W., Voinnet O. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs // *Cell.* – 2007. – Vol. 130. – № 3. – P. 413–426.
199. Isenmann M., Stoddart M.J., Schmelzeisen R., Gross C., Della Bella E., Rothweiler R.M. Basic Principles of RNA Interference: Nucleic Acid Types and In Vitro Intracellular Delivery Methods // *Micromachines.* – 2023. – Vol. 14. – № 7. – P. 1321.
200. Fuchs Wightman F., Giono L.E., Fededa J.P., de la Mata M. Target RNAs Strike Back on MicroRNAs // *Front. Genet.* – 2018. – Vol. 9.
201. 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.
202. Shang R., Lee S., Senavirathne G., Lai E.C. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation // *Nat. Rev. Genet.* – 2023. – Vol. 24. – № 12. – P. 816–833.
203. Lima W.F., Prakash T.P., Murray H.M., Kinberger G.A., Li W., Chappell A.E., Li C.S., Murray S.F., Gaus H., Seth P.P., Swayze E.E., Crooke S.T. Single-stranded siRNAs activate RNAi in

- animals // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – № 5. – P. 883–894.
204. Yu D., Pendergraft H., Liu J., Kordasiewicz H.B., Cleveland D.W., Swayze E.E., Lima W.F., Crooke S.T., Prakash T.P., Corey D.R. Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntingtin expression // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – № 5. – P. 895–908.
205. Hu J., Liu J., Yu D., Aiba Y., Lee S., Pendergraft H., Boubaker J., Artates J.W., Lagier-Tourenne C., Lima W.F., Swayze E.E., Prakash T.P., Corey D.R. Exploring the Effect of Sequence Length and Composition on Allele-Selective Inhibition of Human Huntingtin Expression by Single-Stranded Silencing RNAs // *Nucleic Acid Ther.* – 2014. – Vol. 24. – № 3. – P. 199–209.
206. Prakash T.P., Lima W.F., Murray H.M., Li W., Kinberger G.A., Chappell A.E., Gaus H., Seth P.P., Bhat B., Crooke S.T., Swayze E.E. Identification of metabolically stable 5'-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45. – № 11. – P. 6994–6994.
207. Hu J., Rigo F., Prakash T.P., Corey D.R. Recognition of c9orf72 Mutant RNA by Single-Stranded Silencing RNAs // *Nucleic Acid Ther.* – 2017. – Vol. 27. – № 2. – P. 87–94.
208. Pendergraft H.M., Debacker A.J., Watts J.K. Single-Stranded Silencing RNAs: Hit Rate and Chemical Modification // *Nucleic Acid Ther.* – 2016. – Vol. 26. – № 4. – P. 216–222.
209. Hu J., Shen X., Rigo F., Prakash T.P., Mootha V.V., Corey D.R. Duplex RNAs and ss-siRNAs Block RNA Foci Associated with Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy // *Nucleic Acid Ther.* – 2019. – Vol. 29. – № 2. – P. 73–81.
210. Chang W., Pei Y., Guidry E.N., Zewge D., Parish C.A., Sherer E.C., DiMuzio J., Zhang H., South V.J., Strapps W.R., Sepp-Lorenzino L., Colletti S.L., Stanton M.G. Systematic chemical modifications of single stranded siRNAs significantly improved CTNNB1 mRNA silencing // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 26. – № 18. – P. 4513–4517.
211. Li Z., Wang X., Zhou X., Wang J., Guan Z., Yang Z. Optimization in Chemical Modification of Single-Stranded siRNA Encapsulated by Neutral Cytidinyl/Cationic Lipids // *Front. Chem.* – 2022. – Vol. 10.
212. Ferino A., Miglietta G., Picco R., Vogel S., Wengel J., Xodo L.E. MicroRNA therapeutics: design of single-stranded miR-216b mimics to target KRAS in pancreatic cancer cells // *RNA Biol.* – 2018. – Vol. 15. – № 10. – P. 1273–1285.
213. Matsui M., Prakash T.P., Corey D.R. Argonaute 2-dependent Regulation of Gene Expression by Single-stranded miRNA Mimics // *Mol. Ther.* – 2016. – Vol. 24. – № 5. – P. 946–955.
214. Lima W.F., Murray H., Nichols J.G., Wu H., Sun H., Prakash T.P., Berdeja A.R., Gaus H.J., Crooke S.T. Human Dicer binds short single-strand and double-strand RNA with high affinity

- and interacts with different regions of the nucleic acids // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – № 4. – P. 2535–2548.
215. Castellanos-Gonzalez A., Sadiqova A., Ortega-Mendez J., White A.C. RNA-Based Therapy for *Cryptosporidium parvum* Infection: Proof-of-Concept Studies // *Infect. Immun.* / ed. Saeij J.P.J. – 2022. – Vol. 90. – № 7.
 216. Chen L., Wu Y., Tang Q., Tang F. Oncogenic-tsRNA: A novel diagnostic and therapeutic molecule for cancer clinic // *J. Cancer.* – 2024. – Vol. 15. – № 16. – P. 5403–5414.
 217. George S., Rafi M., Aldarmaki M., ElSiddig M., Al Nuaimi M., Amiri K.M.A. tRNA derived small RNAs—Small players with big roles // *Front. Genet.* – 2022. – Vol. 13.
 218. Tian H., Hu Z., Wang C. The Therapeutic Potential of tRNA-derived Small RNAs in Neurodegenerative Disorders // *Aging Dis.* – 2022. – Vol. 13. – № 2. – P. 389.
 219. Wang K., Liu C.-Y., Fang B., Li B., Li Y.-H., Xia Q.-Q., Zhao Y., Cheng X.-L., Yang S.-M., Zhang M.-H., Wang K. The function and therapeutic potential of transfer RNA-derived small RNAs in cardiovascular diseases: A review // *Pharmacol. Res.* – 2024. – Vol. 206. – P. 107279.
 220. Saad A.A.A., Zhang K., Deng Q., Zhou J., Ge L., Wang H. The functions and modifications of tRNA-derived small RNAs in cancer biology // *Cancer Metastasis Rev.* – 2025. – Vol. 44. – № 1. – P. 38.
 221. Li G., Manning A.C., Bagi A., Yang X., Gokulnath P., Spanos M., Howard J., Chan P.P., Sweeney T., Kitchen R., Li H., Laurent B.D., Aranki S.F., Kontaridis M.I., Laurent L.C., Van Keuren-Jensen K., Muehlschlegel J., Lowe T.M., Das S. Distinct Stress-Dependent Signatures of Cellular and Extracellular tRNA-Derived Small RNAs // *Adv. Sci.* – 2022. – Vol. 9. – № 17.
 222. Wang Y., Weng Q., Ge J., Zhang X., Guo J., Ye G. tRNA-derived small RNAs: Mechanisms and potential roles in cancers // *Genes Dis.* – 2022. – Vol. 9. – № 6. – P. 1431–1442.
 223. Akiyama Y., Ivanov P. tRNA-derived RNAs: Biogenesis and roles in translational control. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* – 2023. – Vol. 14. – № 6. – P. e1805.
 224. Mo D., He F., Zheng J., Chen H., Tang L., Yan F. tRNA-Derived Fragment tRF-17-79MP9PP Attenuates Cell Invasion and Migration via THBS1/TGF- β 1/Smad3 Axis in Breast Cancer // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol. 11.
 225. Zhu L., Li Z., Yu X., Ruan Y., Shen Y., Shao Y., Zhang X., Ye G., Guo J. The tRNA-derived fragment 5026a inhibits the proliferation of gastric cancer cells by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway // *Stem Cell Res. Ther.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 418.
 226. Xu W., Zheng J., Wang X., Zhou B., Chen H., Li G., Yan F. tRF-Val-CAC-016 modulates the transduction of CACNA1d-mediated MAPK signaling pathways to suppress the proliferation of gastric carcinoma // *Cell Commun. Signal.* – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 68.
 227. Han Y., Peng Y., Liu S., Wang X., Cai C., Guo C., Chen Y., Gao L., Huang Q., He M., Shen E.,

- Long J., Yu J., Shen H., Zeng S. tRF3008A suppresses the progression and metastasis of colorectal cancer by destabilizing FOXK1 in an AGO-dependent manner // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2022. – Vol. 41. – № 1. – P. 32.
228. Wang Y., Xia W., Shen F., Zhou J., Gu Y., Chen Y. tRNA-derived fragment tRF-Glu49 inhibits cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer by targeting FGL1 // *Oncol. Lett.* – 2022. – Vol. 24. – № 4. – P. 334.
229. Wang Y., Li Z., Weng Q., Zheng Y., Lin Y., Guo J., Ye G. Clinical Diagnostic Values of Transfer RNA-Derived Fragment tRF-41-YDLBRY73W0K5KKOVD and its Effects on the Growth of Gastric Cancer Cells // *DNA Cell Biol.* – 2023. – Vol. 42. – № 3. – P. 176–187.
230. Zhang S., Gu Y., Ge J., Xie Y., Yu X., Wu X., Sun D., Zhang X., Guo J., Guo J. tRF-33-P4R8YP9LON4VDP inhibits gastric cancer progression via modulating STAT3 signaling pathway in an AGO2-dependent manner // *Oncogene.* – 2024. – Vol. 43. – № 28. – P. 2160–2171.
231. Xu J., Qian B., Wang F., Huang Y., Yan X., Li P., Zhang Q., Li Y., Sun K. Global Profile of tRNA-Derived Small RNAs in Pathological Cardiac Hypertrophy Plasma and Identification of tRF-21-NB8PLML3E as a New Hypertrophy Marker // *Diagnostics.* – 2023. – Vol. 13. – № 12. – P. 2065.
232. Su J., Cheng J., Hu Y., Yu Q., Li Z., Li J., Zheng N., Zhang Z., Yang J., Li X., Zhang Z., Wang Y., Zhu K., Du W., Chen X. Transfer RNA-derived small RNAs and their potential roles in the therapeutic heterogeneity of sacubitril/valsartan in heart failure patients after acute myocardial infarction // *Front. Cardiovasc. Med.* – 2022. – Vol. 9.
233. Sun B., Chen Z., Chi Q., Zhang Y., Gao B. Endogenous tRNA-derived small RNA (tRF3-Thr-AGT) inhibits ZBP1/NLRP3 pathway-mediated cell pyroptosis to attenuate acute pancreatitis (AP) // *J. Cell. Mol. Med.* – 2021. – Vol. 25. – № 22. – P. 10441–10453.
234. Green J.A., Ansari M.Y., Ball H.C., Haqqi T.M. tRNA-derived fragments (tRFs) regulate post-transcriptional gene expression via AGO-dependent mechanism in IL-1 β stimulated chondrocytes // *Osteoarthr. Cartil.* – 2020. – Vol. 28. – № 8. – P. 1102–1110.
235. Du L., Chen W., Zhang D., Cui Y., He Z. The functions and mechanisms of piRNAs in mediating mammalian spermatogenesis and their applications in reproductive medicine // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2024. – Vol. 81. – № 1. – P. 379.
236. Garcia-Borja E., Siegl F., Mateu R., Slaby O., Sedo A., Busek P., Sana J. Critical appraisal of the piRNA-PIWI axis in cancer and cancer stem cells // *Biomark. Res.* – 2024. – Vol. 12. – № 1. – P. 15.
237. Gomes Fernandes M., He N., Wang F., Van Iperen L., Eguizabal C., Matorras R., Roelen B.A.J., Chuva De Sousa Lopes S.M. Human-specific subcellular compartmentalization of P-

- element induced wimpy testis-like (PIWIL) granules during germ cell development and spermatogenesis // *Hum. Reprod.* – 2018. – Vol. 33. – № 2. – P. 258–269.
238. Sasaki T., Shiohama A., Minoshima S., Shimizu N. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome // *Genomics.* – 2003. – Vol. 82. – № 3. – P. 323–330.
239. Li Z., Xu Q., Zhong J., Zhang Y., Zhang T., Ying X., Lu X., Li X., Wan L., Xue J., Huang J., Zhen Y., Zhang Z., Wu J., Shen E.-Z. Structural insights into RNA cleavage by PIWI Argonaute // *Nature.* – 2025. – Vol. 639. – № 8053. – P. 250–259.
240. Vourekas A., Alexiou P., Vrettos N., Maragkakis M., Mourelatos Z. Sequence-dependent but not sequence-specific piRNA adhesion traps mRNAs to the germ plasm // *Nature.* – 2016. – Vol. 531. – № 7594. – P. 390–394.
241. Gainetdinov I., Vega-Badillo J., Cecchini K., Bagci A., Colpan C., De D., Bailey S., Arif A., Wu P.-H., MacRae I.J., Zamore P.D. Relaxed targeting rules help PIWI proteins silence transposons // *Nature.* – 2023. – Vol. 619. – № 7969. – P. 394–402.
242. Roovers E.F., Rosenkranz D., Mahdipour M., Han C.-T., He N., Chuva de Sousa Lopes S.M., van der Westerlaken L.A.J., Zischler H., Butter F., Roelen B.A.J., Ketting R.F. Piwi Proteins and piRNAs in Mammalian Oocytes and Early Embryos // *Cell Rep.* – 2015. – Vol. 10. – № 12. – P. 2069–2082.
243. Xie J., Xing S., Shen B.-Y., Chen H.-T., Sun B., Wang Z.-T., Wang J.-W., Lu X.-X. PIWIL1 interacting RNA piR-017061 inhibits pancreatic cancer growth via regulating EFNA5 // *Hum. Cell.* – 2021. – Vol. 34. – № 2. – P. 550–563.
244. Ding L., Wang R., Xu W., Shen D., Cheng S., Wang H., Lu Z., Zheng Q., Wang L., Xia L., Li G. PIWI-interacting RNA 57125 restrains clear cell renal cell carcinoma metastasis by downregulating CCL3 expression // *Cell Death Discov.* – 2021. – Vol. 7. – № 1. – P. 333.
245. Wang X., Huang P., Lei M., Ma Y., Chen H., Sun J., Hu Y., Shi J. Global expression and functional analysis of human piRNAs during HSV-1 infection // *Virus Res.* – 2023. – Vol. 328. – P. 199087.
246. Qi T., Cao H., Sun H., Feng H., Li N., Wang C., Wang L. piR-19166 inhibits migration and metastasis through CTTN/MMPs pathway in prostate carcinoma // *Aging (Albany, NY).* – 2020. – Vol. 12. – № 18. – P. 18209–18220.
247. Liu Q., Chen Q., Zhou Z., Tian Z., Zheng X., Wang K. piRNA-18 Inhibition Cell Proliferation, Migration and Invasion in Colorectal Cancer // *Biochem. Genet.* – 2023. – Vol. 61. – № 5. – P. 1881–1897.
248. Murtola M., Wenska M., Strömberg R. PNAzymes that are artificial RNA restriction enzymes // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132. – № 26. – P. 8984–8990.
249. Häner R., Hall J., Pfützner A., Hüsken D. Development of artificial ribonucleases // *Pure Appl.*

- Chem. – 1998. – Vol. 70. – № 1. – P. 111–116.
250. Niittymäki T., Lönnberg H. Artificial ribonucleases // *Org. Biomol. Chem.* – 2006. – Vol. 4. – № 1. – P. 15–25.
251. Trawick B.N., Osiek T.A., Bashkin J.K. Enhancing Sequence-Specific Cleavage of RNA within a Duplex Region: Incorporation of 1,3-Propanediol Linkers into Oligonucleotide Conjugates of Serinol–Terpyridine // *Bioconjug. Chem.* – 2001. – Vol. 12. – № 6. – P. 900–905.
252. Niittymäki T., Kaukinen U., Virta P., Mikkola S., Lönnberg H. Preparation of Azacrown-functionalized 2'-O-Methyl oligoribonucleotides, potential artificial RNases // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – Vol. 15. – № 1. – P. 174–184.
253. Magda D., Wright M., Crofts S., Lin A., Sessler J.L. Metal complex conjugates of antisense DNA which display ribozyme-like activity // *Journal of the American Chemical Society.* – 1997. – Vol. 119. – № 29. – P. 6947–6948.
254. Luige O., Karalè K., Bose P.P., Bollmark M., Tedebark U., Murtola M., Strömberg R. Influence of sequence variation on the RNA cleavage activity of Zn²⁺-dimethyl-dppz-PNA-based artificial enzymes // *RSC Adv.* – 2022. – Vol. 12. – № 9. – P. 5398–5406.
255. Luige O., Bose P.P., Stulz R., Steunenberg P., Brun O., Andersson S., Murtola M., Strömberg R. Zn²⁺-Dependent peptide nucleic acid-based artificial ribonucleases with unprecedented efficiency and specificity // *Chem. Commun.* – 2021. – Vol. 57. – № 83. – P. 10911–10914.
256. Ghidini A., Murtola M., Strömberg R. Influence of conjugation and other structural changes on the activity of Cu²⁺ based PNAzymes // *Org. Biomol. Chem. Royal Society of Chemistry,* – 2016. – Vol. 14. – № 9. – P. 2768–2773.
257. Murtola M., Ghidini A., Virta P., Strömberg R. Zinc Ion-Dependent peptide nucleic acid-based artificial enzyme that cleaves RNA-Bulge size and sequence dependence // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22. – № 11.
258. Beloglazova N.G., Fabani M.M., Polushin N.N., Sil'nikov V. V., Vlassov V. V., Bichenkova E. V., Zenkova M.A. Site-selective artificial ribonucleases: Oligonucleotide conjugates containing multiple imidazole residues in the catalytic domain // *J. Nucleic Acids.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–17.
259. Mironova N.L., Pyshnyi D. V., Shtadler D. V., Fedorova A.A., Vlassov V. V., Zenkova M.A. RNase T1 mimicking artificial ribonuclease // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – № 7. – P. 2356–2367.
260. Mironova N.L., Pyshnyi D. V., Stadler D. V., Prokudin I. V., Boutorine Y.I., Ivanova E.M., Zenkova M.A., Gross H.J., Vlassov V. V. G-specific RNA-cleaving conjugates of short peptides and oligodeoxyribonucleotides // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2006. – Vol. 23. – № 6. – P. 591–602.

261. Zuckermann R.N., Schultz P.G. Site-selective cleavage of structured RNA by a staphylococcal nuclease-DNA hybrid. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1989. – Vol. 86. – № 6. – P. 1766–1770.
262. Kanaya S., Nakai C., Konishi A., Inoue H., Ohtsuka E., Ikehara M. A hybrid ribonuclease H. A novel RNA cleaving enzyme with sequence-specific recognition. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – № 12. – P. 8492–8498.
263. Beloglazova N.G., Sil'nikov V.N., Zenkova M.A., Vlassov V.V. Cleavage of yeast tRNA^{Phe} with complementary oligonucleotide conjugated to a small ribonuclease mimic // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 481. – № 3. – P. 277–280.
264. Gnaccarini C., Peter S., Scheffer U., Vonhoff S., Klussmann S., Göbel M.W. Site-specific cleavage of RNA by a metal-free artificial nuclease attached to antisense oligonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – № 24. – P. 8063–8067.
265. Williams A., Staroseletz Y., Zenkova M.A., Jeannin L., Aojula H., Bichenkova E. V. Peptidyl–Oligonucleotide Conjugates Demonstrate Efficient Cleavage of RNA in a Sequence-Specific Manner // *Bioconjug. Chem.* – 2015. – Vol. 26. – № 6. – P. 1129–1143.
266. Inoue H., Furukawa T., Tamura T., Komatsu Y., Ohtsuka E. Two-terpyridine.Cu(II) complexes-containing antisense systems for rapid and highly site-specific RNA cleavage. // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 2000. – Vol. 44. – № 44. – P. 279–280.
267. Beloglazova N.G. Sequence-specific artificial ribonucleases. I. Bis-imidazole-containing oligonucleotide conjugates prepared using precursor-based strategy // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – № 13. – P. 3887–3897.
268. Takayama H., Sakamoto S., Kitamura M., Inoue H. Development of Site-specific Artificial Ribonucleases // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 2007. – Vol. 51. – № 1. – P. 203–204.
269. Staroseletz Y., Williams A., Burusco K.K., Alibay I., Vlassov V. V., Zenkova M.A., Bichenkova E. V. 'Dual' peptidyl-oligonucleotide conjugates: Role of conformational flexibility in catalytic cleavage of RNA // *Biomaterials.* – 2017. – Vol. 112. – P. 44–61.
270. Staroseletz Y., Amirloo B., Williams A., Lomzov A., Burusco K.K., Clarke D.J., Brown T., Zenkova M.A., Bichenkova E. V. Strict conformational demands of RNA cleavage in bulge-loops created by peptidyl-oligonucleotide conjugates // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – № 19. – P. 10662–10679.
271. Lönnberg H. Cleavage of RNA phosphodiester bonds by small molecular entities: A mechanistic insight // *Organic and Biomolecular Chemistry. Org. Biomol. Chem.* – 2011. – Vol. 9. – № 6. – P. 1687–1703.
272. Canaple L., Hüskén D., Hall J., Häner R. Artificial ribonucleases: efficient and specific in vitro cleavage of human c-raf-1 RNA. // *Bioconjug. Chem.* – 2002. – Vol. 13. – № 5. – P. 945–951.
273. Kuzuya A., Mizoguchi R., Morisawa F., Komiyama M. Novel approach for SNP genotyping

- based on site-selective RNA scission // *Nucleic Acids Res. Suppl. Nucleic Acids Res Suppl.*, – 2002. – № 2.
274. Zellmann F., Göbel M.W. A trisbenzimidazole phosphoramidite building block enables high-yielding syntheses of RNA-cleaving oligonucleotide conjugates // *Molecules. MDPI AG.*, – 2020. – Vol. 25. – № 8.
275. Johnson K.C., Kilikevicius A., Hofman C., Hu J., Liu Y., Aguilar S., Graswich J., Han Y., Wang T., Westcott J.M., Brekken R.A., Peng L., Karagkounis G., Corey D.R. Nuclear localization of Argonaute 2 is affected by cell density and may relieve repression by microRNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2024. – Vol. 52. – № 4. – P. 1930–1952.
276. Weber S., Weinrich T., Scheffer U., Kalden E., Göbel M.W. Click Conjugates of Artificial Ribonucleases: Sequence Specific Cleavage with Multiple Turnover // *Chem. – A Eur. J.* – 2025.
277. Kabilova T.O., Shmendel E. V., Gladkikh D. V., Chernolovskaya E.L., Markov O. V., Morozova N.G., Maslov M.A., Zenkova M.A. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2018. – Vol. 123. – P. 59–70.
278. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – № 20. – P. e179.
279. Barbier B., Brack A. Search for catalytic properties of simple polypeptides // *Orig. Life Evol. Biosph. Kluwer Academic Publishers.* – 1987. – Vol. 17. – № 3–4. – P. 381–390.
280. Barbier B., Brack A. Basic polypeptides accelerate the hydrolysis of ribonucleic acids // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – № 20. – P. 6880–6882.
281. Brack A., Barbier B. Chemical activity of simple basic peptides // *Orig. Life Evol. Biosph. Kluwer Academic Publishers.* – 1990. – Vol. 20. – № 2. – P. 139–144.
282. Pyshny'i D. V, Repkova M.N., Lokhov S.G., Ivanova E.M., Ven'iaminova A.G., Zarytova V.F. [Artificial ribonucleases I. Targeted RNA cleavage by 5'-peptidyloligodeoxyribonucleotides containing arginine and leucine residues]. // *Bioorg. Khim.* – 1997. – Vol. 23. – № 6. – P. 497–504.
283. Mironova N.L., Pyshnyi D. V, Ivanova E.M., Zenkova M.A., Gross H.J., Vlassov V. V. Covalently attached oligodeoxyribonucleotides induce RNase activity of a short peptide and modulate its base specificity. // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – № 6. – P. 1928–1936.
284. Mironova N.L., Pyshnyi D. V., Ivanova E.M., Zenkova M.A., Gross G.J., Vlasov V. V. Artificial Ribonucleases: Oligonucleotide–Peptide Conjugates That Cleave RNA at the GpX

- and PypA Phosphodiester Bonds // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2002. – Vol. 385. – № 1–6. – P. 196–200.
285. Mironova N.L., Boutorine Y.I., Pyshnyi D. V., Ivanova E.M., Zenkova M.A., Vlassov V. V. Ribonuclease Activity of the Peptides with Alternating Arginine and Leucine Residues Conjugated to Tetrathymidilate // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* – 2004. – Vol. 23. – № 6–7. – P. 885–890.
286. Amirloo B., Staroseletz Y., Yousaf S., Clarke D.J., Brown T., Aojula H., Zenkova M.A., Bichenkova E. V. “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.
287. Salvio R., Mandolini L., Savelli C. Guanidine–Guanidinium Cooperation in Bifunctional Artificial Phosphodiesterases Based on Diphenylmethane Spacers; gem -Dialkyl Effect on Catalytic Efficiency // *J. Org. Chem.* – 2013. – Vol. 78. – № 14. – P. 7259–7263.
288. Bautista-Sánchez D., Arriaga-Canon C., Pedroza-Torres A., De La Rosa-Velázquez I.A., González-Barrios R., Contreras-Espinosa L., Montiel-Manríquez R., Castro-Hernández C., Fragoso-Ontiveros V., Álvarez-Gómez R.M., Herrera L.A. 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.
289. Xu L., Wu Z., Chen Y., Zhu Q., Hamidi S., Navab R. 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.* – 2014. – Vol. 9. – № 8. – P. e103698.
290. Bai X., Hua S., Zhang J., Xu S. 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.
291. Zhu Y., Gu J., Li Y., Peng C., Shi M., Wang X., Wei G., Ge O., Wang D., Zhang B., Wu J., Zhong Y., Shen B., Chen H. 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.
292. Eis P.S., Tam W., Sun L., Chadburn A., Li Z., Gomez M.F., Lund E., Dahlberg J.E. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – Vol. 102. – № 10. – P. 3627–3632.
293. Bayraktar R., Van Roosbroeck K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics // *Cancer and Metastasis Reviews.* – 2018. – Vol. 37. – № 1. – P. 33–44.
294. Wang H., Li Z.Y., Xu Z.H., Chen Y.L., Lu Z.Y., Shen D.Y., Lu J.Y., Zheng Q.M., Wang L.Y., Xu L.W., Xue D.W., Wu H.Y., Xia L.Q., Li G.H. The prognostic value of miRNA-18a-5p in

- clear cell renal cell carcinoma and its function via the miRNA-18a-5p/HIF1A/PVT1 pathway // *J. Cancer*. – 2020. – Vol. 11. – № 10. – P. 2737–2748.
295. Mai S.J., Xiao R.W., Shi L., Zhou X.M., Yang T., Zhang M.Y., Weng N.Q., Zhao X.G., Wang R.Q., Liu J., Sun R., Qin H. De, Wang H.Y. MicroRNA-18a promotes cancer progression through SMG1 suppression and mTOR pathway activation in nasopharyngeal carcinoma // *Cell Death Dis.* – 2019. – Vol. 10. – № 11.
296. Kirnos M.D., Khudyakov I.Y., Alexandrushkina N.I., Vanyushin B.F. 2-Amino adenine is an adenine substituting for a base in S-2L cyanophage DNA // *Nature*. – 1977. – Vol. 270. – № 5635. – P. 369–370.
297. 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.
298. Haaima G., Hansen H.F., Christensen L., Dahl O., Nielsen P.E. Increased DNA binding and sequence discrimination of PNA oligomers containing 2,6-diaminopurine // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – Vol. 25. – № 22. – P. 4639–4643.
299. 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.
300. Luige O., Murtola M., Ghidini A., Strömberg R. Further probing of Cu²⁺-dependent PNAzymes acting as artificial RNA restriction enzymes // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 4. – P. 1–12.
301. Kuznetsova I.L., Zenkova M.A., Gross H.J., Vlassov V.V. Enhanced RNA Cleavage Within Bulge-Loops by an Artificial Ribonuclease // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – № 4. – P. 1201–1212.
302. Hüsken D., Goodall G., Blommers M.J.J., Jahnke W., Hall J., Häner R., Moser H.E. Creating RNA bulges: cleavage of RNA in RNA/DNA duplexes by metal ion catalysis // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35. – № 51. – P. 16591–16600.
303. Bibillo A., Figlerowicz M., Kierzek R. The non-enzymatic hydrolysis of oligoribonucleotides VI. The role of biogenic polyamines // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – № 19. – P. 3931–3937.
304. Riepe A., Beier H., Gross H.J. Enhancement of RNA self-cleavage by micellar catalysis // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 457. – № 2. – P. 193–199.
305. Hosono K., Kuwasaki T., Tsukahara S., Takai K., Takaku H. 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.
306. 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.

307. 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.
308. Lennox K.A., Behlke M.A. A Direct Comparison of Anti-microRNA Oligonucleotide Potency // *Pharm. Res.* – 2010. – Vol. 27. – № 9. – P. 1788–1799.
309. Vermeulen A., Robertson B., Dalby A.B., Marshall W.S., Karpilow J., Leake D., Khvorova A., Baskerville S. Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function // *RNA.* – 2007. – Vol. 13. – № 5. – P. 723–730.
310. Hirao I., Nishimura Y., Tagawa Y., Watanabe K., Miura K. 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.
311. Yoshizawa S., Ueda T., Ishido Y., Miura K., Watanabe K., Hirao I. 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.
312. Patutina O.A., Miroshnichenko S.K., Lomzov A.A., Mironova N.L., Zenkova M.A. Search for oligonucleotides selectively binding oncogenic miR-21 // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2017. – Vol. 43. – № 1. – P. 29–37.
313. Vlassov V.V., Zuber G., Felden B., Behr J.P., Giege R. 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.
314. Wike-Hooley J.L., Haveman J., Reinhold H.S. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease // *Radiotherapy and Oncology.* – 1984. – Vol. 2. – № 4. – P. 343–366.
315. 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.
316. De Milito A., Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors // *Future Oncology.* – 2005. – Vol. 1. – № 6. – P. 779–786.
317. 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.
318. 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.
319. Compagno D., Lampe J.N., Bourget C., Kutyavin I. V., Yurchenko L., Lukhtanov E.A., Gorn V. V., Gamper H.B., Toulmé J.J. 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.
320. Shaw J.-P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol. 19. – № 4. – P. 747–750.
321. Kingston E.R., Bartel D.P. Global analyses of the dynamics of mammalian microRNA metabolism // *Genome Res.* – 2019. – Vol. 29. – № 11. – P. 1777–1790.
322. Ragan C., Zuker M., Ragan M.A. Quantitative Prediction of miRNA-mRNA Interaction Based on Equilibrium Concentrations // *PLoS Comput. Biol.* – 2011. – Vol. 7. – № 2. – P. e1001090.
323. Jiang L.-H., Ge M.-H., Hou X.-X., Cao J., Hu S.-S., Lu X.-X., Han J., Wu Y.-C., Liu X., Zhu X., Hong L.-L., Li P., Ling Z.-Q. miR-21 regulates tumor progression through the miR-21-PDCD4-Stat3 pathway in human salivary adenoid cystic carcinoma // *Lab. Investig.* – 2015. – Vol. 95. – № 12. – P. 1398–1408.
324. O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C. V., Mendell J.T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // *Nature.* – 2005. – Vol. 435. – № 7043. – P. 839–843.
325. Zhao X., Xu Y., Sun X., Ma Y., Zhang Y., Wang Y., Guan H., Jia Z., Li Y., Wang Y. 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.
326. Radulovic V., Heider T., Richter S., Moertl S., Atkinson M.J., Anastasov N. 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.
327. Chi L.H., Cross R.S.N., Redvers R.P., Davis M., Hediye-zadeh S., Mathivanan S., Samuel M., Lucas E.C., Mouchemore K., Gregory P.A., Johnstone C.N., Anderson R.L. MicroRNA-21 is immunosuppressive and pro-metastatic via separate mechanisms // *Oncogenesis.* – 2022. – Vol. 11. – № 1. – P. 38.
328. Martin del Campo S.E., Latchana N., Levine K.M., Grignol V.P., Fairchild E.T., Jaime-Ramirez A.C., Dao T.-V., Karpa V.I., Carson M., Ganju A., Chan A.N., Carson III W.E. MiR-21 Enhances Melanoma Invasiveness via Inhibition of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 Expression: In Vivo Effects of MiR-21 Inhibitor // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. e0115919.
329. Miroshnichenko S.K., Amirloo B., Bichenkova E. V., Vlassov V. V., Zenkova M.A., Patutina O.A. 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.
330. Fang Y., Wu Q., Wang F., Liu Y., Zhang H., Yang C., Zhu Z. Aptamer-RIBOTAC Strategy Enabling Tumor-Specific Targeted Degradation of MicroRNA for Precise Cancer Therapy //

Small Methods. – 2024.

331. Yu S., Liao R., Bai L., Guo M., Zhang Y., Zhang Y., Yang Q., Song Y., Li Z., Meng Q., Wang S., Huang X. Anticancer effect of hUC-MSC-derived exosome-mediated delivery of PMO-miR-146b-5p in colorectal cancer // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2023. – Vol. 14. – № 5. – P. 1352.
332. Li Y., Chen Y., Li J., Zhang Z., Huang C., Lian G., Yang K., Chen S., Lin Y., Wang L., Huang K., Zeng L. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy // *Cancer Sci.* – 2017. – Vol. 108. – № 7. – P. 1493–1503.
333. Bose D., Nahar S., Rai M.K., Ray A., Chakraborty K., Maiti S. Selective inhibition of miR-21 by phage display screened peptide // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43. – № 8. – P. 4342–4352.
334. Hashemi M., Mirdamadi M.S.A., Talebi Y., Khaniabad N., Banaei G., Daneii P., Gholami S., Ghorbani A., Tavakolpournegari A., Farsani Z.M., Zarrabi A., Nabavi N., Zandieh M.A., Rashidi M., Taheriazam A., Entezari M., Khan H. 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.
335. Wagenaar T.R., Zabudoff S., Ahn S.M., Allerson C., Arlt H., Baffa R., Cao H., Davis S., Garcia-Echeverria C., Gaur R., Huang S.M.A., Jiang L., Kim D., Metz-Weidmann C., Pavlicek A., Pollard J., Reeves J., Rocnik J.L., Scheidler S. et al. Anti-miR-21 suppresses Hepatocellular carcinoma growth via broad transcriptional network deregulation // *Mol. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 13. – № 6. – P. 1009–1021.