

На правах рукописи

СТАРОСЕЛЕЦ ЯРОСЛАВ ЮРЬЕВИЧ

**СПОНТАННАЯ И КАТАЛИЗИРУЕМАЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-
ПЕПТИДНЫМИ КОНЬЮГАТАМИ РЕАКЦИЯ
ТРАНСЭТЕРИФИКАЦИИ РНК**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научный руководитель:

Зенкова Марина Аркадьевна, д.б.н., профессор

Официальные оппоненты:

Позмогова Галина Евгеньевна, д.х.н., профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный
научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА
России, руководитель лаборатории

Готтих Марина Борисовна, д.х.н., профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Научно-
исследовательский институт физико-химической биологии имени
А. Н. Белозерского МГУ, г.н.с.

Жарков Дмитрий Олегович, д.б.н., профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО
РАН, зав. лабораторий

Защита состоится « 6 » декабря _____ 2019 г. в 10:00
на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Института
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом и диссертацией можно ознакомиться на сайте
www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « 6 » _____ ноября _____ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Особенность строения РНК по сравнению с ДНК – наличие атома кислорода в 2'-положении рибозы – обуславливает различие их ролей в живых организмах. Кислород в 2'-положении рибозы в РНК постоянно «стремится» атаковать расположенный вблизи атом фосфора по механизму нуклеофильного замещения S_N2 , в результате чего скорость гидролиза фосфодиэфирной связи в физиологических условиях для РНК в $\sim 10^5$ раз выше, чем для ДНК. Легкость расщепления позволяет проводить тонкую регуляцию транскриптома, оперативно избавляясь от выполнивших свою функцию РНК. Легкость расщепления РНК является плюсом и для исследователя, ставящего целью точечное воздействие на транскриптом за счет селективного расщепления определенной РНК. Огромное количество заболеваний связано с изменением концентрации в клетке определенных РНК, как кодирующих, так и некодирующих. Такие РНК являются мишенями для терапевтических препаратов, селективность действия которых обеспечивается комплементарными взаимодействиями с РНК-мишенью, а уничтожение РНК достигается за счет ее расщепления клеточными ферментами или самим терапевтическим агентом.

Существует несколько методов селективного, или сайт-направленного расщепления РНК. Первыми были предложены антисмысловые олигонуклеотиды (АСО); к настоящему моменту существуют четыре медицинских препарата, одобренных FDA, действующих по этому принципу, а также два одобренных FDA препарата на основе siРНК. Препараты на основе рибозимов и ДНКзимов находятся на разных стадиях клинических испытаний. Искусственные рибонуклеазы (иРНКазы) – конъюгаты АСО и РНК-расщепляющих конструкций – представляют собой еще один способ инактивации РНК. На основе иРНКаз пока не создано ни одного препарата, который дошел бы до клинических испытаний. В иРНКазах используют ионы металлов или различные органические конструкции. На данный момент не создано иРНКаз сайт-направленного действия на основе пептидов, однако это представляется и необходимым ввиду биосовместимости таких иРНКаз. Можно ожидать повышение эффективности подавления РНК в клетке под действием иРНКаз по сравнению с АСО, поскольку в дополнение к блокированию РНК будет добавлено расщепление ее иРНКазой. Таким образом, создание олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК) сайт-направленного действия представляет интерес в качестве пути увеличения эффективности существующих способов селективного расщепления РНК.

Одним из важнейших факторов, определяющих способность ОПК или другого агента сайт-направленно расщеплять РНК, является выбор сайта расщепления. Скорость расщепления РНК по фосфодиэфирным различным связям может отличаться в 10^4 раз, что определяется структурой РНК, затрудняющей или, наоборот облегчающей расщепление определенной связи за счет конформационных изменений. На сегодняшний день нет возможности точно предсказать слабые сайты РНК, позволяющие добиться быстрого

расщепления. Проблема выбора сайта расщепления требует выявления общих закономерностей протекания реакции трансэтерификации РНК, выявления зависимости скорости расщепления по определенному сайту от прилегающих нуклеотидов, а также от вторичной и третичной структуры РНК. Для выявления таких закономерностей требуется исследование спонтанной реакции трансэтерификации в разных сайтах молекулы РНК, обладающей различными элементами вторичной и третичной структуры.

Целью настоящей работы являлось изучение закономерностей протекания спонтанной реакции трансэтерификации РНК и этой реакции, катализируемой олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК) различных типов: линейных, двойных, петлеобразующих. В ходе работы были поставлены следующие задачи: 1. Анализ закономерностей протекания спонтанной реакции трансэтерификации в модельной системе двух 96-звенных фрагментов вирусных РНК. 2. Анализ реакции трансэтерификации, катализируемой ОПК различных типов. 3. Анализ соотношений структура-активность для ОПК различного строения. 3.1 Выяснение закономерностей расщепления модельной тРНК^{Phe} линейными ОПК. 3.2 Влияние стерических факторов на расщепления тРНК^{Phe} двойными ОПК. 3.3 Исследование закономерностей взаимодействия с тРНК^{Phe} и ее расщепления петлеобразующими ОПК. 4. Исследование закономерностей расщепления тРНК^{Phe} ОПК в режиме многооборотной реакции.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые продемонстрировано, что вторичная и третичная структура РНК обуславливает направление и скорость неферментативной рекомбинации молекул РНК, происходящей в результате двух сопряженных реакций трансэтерификации, приводящих сначала к расщеплению РНК, а затем к лигированию продуктов расщепления. Показано, что наиболее эффективно эта реакция протекает в различных петлях.

Впервые продемонстрировано сайт-направленное расщепление РНК на модельной тРНК^{Phe} дрожжей олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК) трех типов: линейных, двойных и петлеобразующих. Впервые показано расщепление РНК ОПК по петле, формируемой при связывании РНК с ОПК. Показана зависимость степени расщепления как от длины и последовательности петли, так и от структуры конъюгата.

Положения, выносимые на защиту

- Спонтанная реакция трансэтерификации РНК – лигирование – наиболее эффективно происходит в боковых и внутренних петлях, фланкированных стабильными двуцепочечными участками.

- Под действием конъюгатов антисмыслового олигонуклеотида, способного разворачивать вторичную структуру РНК, и пептида [(LR)₂G]₂ или (LR)₄GNH₂ происходит сайт-направленное расщепление РНК. Олигонуклеотид-пептидные конъюгаты различной структуры: линейные, двойные, петлеобразующие количественно расщепляют модельную РНК *in vitro*.

- Введение в структуру пептида дополнительного остатка глицина значительно повышает эффективность и меняет паттерн расщепления РНК конъюгатом, вероятно, за счет повышения конформационной подвижности пептида.

- Для высокой эффективности расщепления РНК необходима высокая конформационная подвижность пептида, способы обеспечения которой зависят от типа ОПК.

- Расщепление РНК ОПК происходит как по целевому сайту, расположенному в непосредственной близости от пептида, так и по связям, сближенным с пептидом за счет третичной структуры РНК. Расщепление по целевому участку происходит по связям С-А, А-С и А-Г, а вне целевого участка расщепление РНК происходит либо с Руг-Х, либо с G-X специфичностью, определяемой структурой ОПК.

Публикации и апробация работы. По материалам работы опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS. Результаты работы были представлены на 5 российских и международных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Текст изложен на 172 страницах, иллюстрирован 40 рисунками, включает 14 таблиц, список литературы содержит 298 библиографических источников.

Вклад автора. Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Эксперименты по идентификации продуктов рекомбинации проведены С.Ю. Нечаевым и автором.

Эксперименты по молекулярной динамике проведены автором, К. Уотсон, К. Буруско, А.А. Ломзовым.

Разработка протокола синтеза, синтез и доказательство структуры ОПК были проведены д-ром А. Вильямсом и Б. Амирлоо под руководством проф. Е. В. Биченковой (the University of Manchester, School of Health Sciences, Division of Pharmacy & Optometry).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Рекомбинация РНК

1.1 Модельная система и условия реакции

Для исследования реакции рекомбинации РНК (сопряженных реакций расщепления/лигирования) была использована модельная система, состоящая из двух 96-звенных фрагментов РНК: фрагмент М2 РНК вируса гриппа и фрагмент Н1V РНК (далее М2-РНК и Н1V-РНК) (Рис. 1).

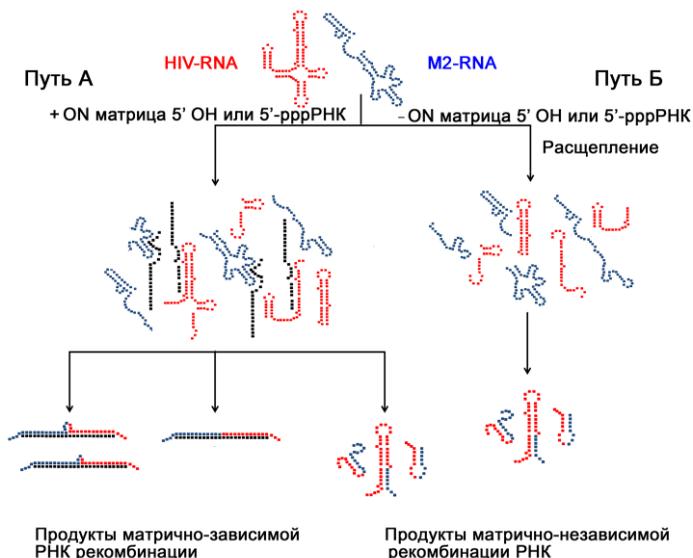


Рис. 2 Схема путей рекомбинации РНК в присутствии и в отсутствие ON-матрицы. Фрагменты, соответствующие HIV-РНК, показаны красным, M2-РНК – синим, ON - черным.

1.3 Классификация рекомбинантных продуктов

Некоторые продукты рекомбинации (Таблица 1) могут считаться основными (Pr-1, Pr-4), так как встречаются в десятках колоний, другие продукты были обнаружены только в нескольких колониях (Pr-9). Были идентифицированы уникальные продукты, обнаруженные однократно (Pr-2). Группа G1 объединяет матрично-зависимые продукты (Pr-2 – Pr-9), формируемые при связывании фрагментов РНК с ON-матрицей. Остальные продукты отнесены к матрично-независимым (группы G2 – G5), хотя матрица может присутствовать в реакционной смеси. Продукт Pr-1 формируется как при участии, так и без участия матрицы, и выделен в группу G0.

Группа матрично-независимых продуктов оказалась обширной и неоднородной по составу. Несколько продуктов, обладающих практически идентичной структурой, были объединены в группу G2 (Pr-10 – Pr-19). Группа G3 объединяет набор продуктов умеренной частоты встречаемости. К ней примыкает продукт Pr-23, найденный только в F-серии, но в заметном количестве. Группа G4 объединяет продукты, образованные при участии 5'-ppp-M2-РНК. В группе G-5 собраны оставшиеся редкие продукты.

1.4. Продукт Pr-1 (группа G0)

Продукт Pr-1 формируется не только в присутствии, но и в отсутствие ON-матрицы, причем в серии В (ON-) обнаружено почти в два раза больше

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность продуктов рекомбинации HIV-РНК и M2-РНК в участке между H_{for} и M_{rev} ПЦР праймерами.

Группа	Продукт	Последовательность между праймерами	Число колоний в экспериментальной серии			
			A	B	C	F
G0	Pr-1	[H _F CUAGACGGUGAGUGCUGUG[M _R]	21	37	1	7
G1	Pr-2	[H _F CUAGACGGUAGAGUGCUGUG[M _R]			1	
	Pr-4	[H _F CUAGACGGUGUAGAGUGCUGUG[M _R]	14		87	
	Pr-9	[H _F CUAGACGGUGUAGAGUGCUGUG[M _R]	5			
G2	Pr-10	[H _F CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGUGGAUGAGGGAAGAAUUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG[M _R]		1		
	Pr-13	[H _F CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGUGGGCGCUGAGGGAAGAAUUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG[M _R]	12	27		
	Pr-19	[H _F CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGUGGCUGAGGGAAGAAUUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG[M _R]	7	6		
G3	Pr-20	[H _F]G[M _R]	4	1		1
	Pr-23	[H _F] [M _R]				26
G4	Pr-25	[H _F CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGUGGGCGCCCGAACAGGGACUUAAAAGUGAAAGUAACAGGGGGCCUUCUACGGAAGGAGUACCGAGUCUAUGAGGGAAGAAUUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG[M _R]	1			
G5	Pr-35	[H _F CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGUGGGCGCCGCUUGUG[M _R]		3		
	Pr-50	[H _F CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGAGUGCUGUG[M _R]	1			

колоний, содержащих Pr-1, чем в серии А (ON+). Pr-1 является главным продуктом в этой серии. Видимо, вступающие в реакцию лигирования фрагменты образуют прочную третичную структуру, обеспечивающую лигирование.

1.5. Продукты G-1

Данная группа включает восемь типов продуктов: Pr2-Pr9, образующихся только в присутствии ON-матрицы. Лигирование происходит в боковых или внутренних петлях. Наблюдается предпочтительное образование одного типа продукта (Pr-4), найденного в 87 колониях, тогда как все остальные продукты найдены в лучшем случае в 5 колониях. Вероятно, трехнуклеотидная боковая петля наиболее выгодна для реакции лигирования. Среди полученных продуктов не встречаются двух- и четырехзвенные боковые петли. Одно из объяснений состоит в том, что в двух- и четырехзвенных боковых петлях и

других не выявленных структурах равновесие реакции трансэтерификации смещено в сторону расщепления, тогда как в структурах, встречающихся в идентифицируемых продуктах, равновесие смещено в сторону лигирования.

В присутствие матрицы большинство выявленных продуктов являются матрично-зависимыми, что говорит о том, что матрица, связывая значительную часть РНК, «вынуждает» ее идти по пути матрично-зависимой рекомбинации, тем самым частично перекрывая путь матрично-независимой рекомбинации.

1.6 Продукты G-2

Продукты данной группы характеризуются общей структурой, большая часть которой представлена длинным доменом HIV-РНК и коротким 6-8-звенным фрагментом M2-РНК. Общая длина продуктов составляет 104-110 н. Продукты различаются структурой участка, в котором происходит лигирование. Продукты G2 чаще всего встречаются в серии В (46%), менее представлены в серии А (23%) и редко встречаются в серии С (3%). Разницу представленности продуктов G2 между А и В сериями можно объяснить тем, что присутствие матрицы сдвигает процесс рекомбинации в сторону образования матрично-зависимых продуктов.

Группа продуктов G2 является иллюстрацией принципа «направленной рекомбинации»: обусловленности протекания реакций трансэтерификации РНК по участкам, выбор которых определяется структурой РНК. В случае продуктов G1 формирование структуры обеспечивается участием матрицы. В случае продуктов G2 протяженный домен HIV-РНК обеспечивает сохранение спектра близких структур на протяжении времени, достаточного для протекания реакции лигирования.

1.7 Заключение

Была исследована модельная система из двух 96-звенных фрагментов РНК в условиях, обеспечивающих возможность протекание реакций трансэтерификации, катализируемых ионами Mg^{2+} . Доказана возможность образования спектра продуктов в результате рекомбинации РНК. Показано, что наиболее эффективно лигирование происходит в боковых и внутренних петлях длиной 1-6 н, фланкированных стабильными двуцепочечными участками.

Реакции трансэтерификации не являются случайными, вторичная и третичная структура РНК направляет их протекание по определенным участкам. При формировании комплекса, в котором сближены 2',3'-циклофосфат и 5'-ОН, возможна реакция лигирования. Такой комплекс может возникнуть спонтанно или может быть индуцирован комплементарным олигонуклеотидом-матрицей.

2 Сайт-направленное расщепление модельной РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами различной структуры

2.1 Введение

Олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (ОПК) представляют собой иРНКазы, специфичность действия которых обеспечивается РНК-узнающим

доменом, а каталитический эффект – РНК-расщепляющим доменом. В нашей работе в роли РНК-узнающего домена выступает олигодезоксирибонуклеотид. В качестве РНК-расщепляющего домена ОПК содержит пептид из чередующихся остатков лейцина и аргинина.

2.2 РНК-субстрат

В качестве модельной была выбрана тРНК^{Phe} дрожжей (транскрипт) (Рис. 3А). Ранее тРНК^{Phe} была использована в ряде исследований, например, для изучения свойств имидазол-содержащих иРНКаз. тРНК^{Phe} содержит структурные элементы, характерные для любой природной РНК. Соответственно, данные по расщеплению тРНК^{Phe} позволят предсказать действие конъюгатов при адресации к клинически значимым РНК.

2.3 Линейные ОПК

2.3.1 Дизайн линейных ОПК

ОПК первой серии (линейные) представляет собой олигонуклеотид с присоединенным к его 5'-концевому фосфату каталитическим пептидом (Рис. 3Б). Первая серия включала пять конъюгатов. В качестве узнающего домена использован 17-звенный олигонуклеотид, комплементарный вариательной и ТΨС-петлям тРНК^{Phe}. При образовании комплекса с тРНК^{Phe} пептид располагается в непосредственной близости от целевого участка 61-CACAG-65. Олигонуклеотид, связываясь с тРНК^{Phe}, разворачивает ТΨС-шпильку и делает участок 61-CACAG-65 доступным для расщепления. Выбор последовательности олигонуклеотида и, соответственно, целевого участка расщепления обусловлен двумя причинами. Во-первых, последовательность CACAG содержит две СА-связи, которые высокочувствительны к расщеплению. Во-вторых, ранее описанные имидазол-содержащие иРНКазы также были направлены к этому участку тРНК^{Phe}.

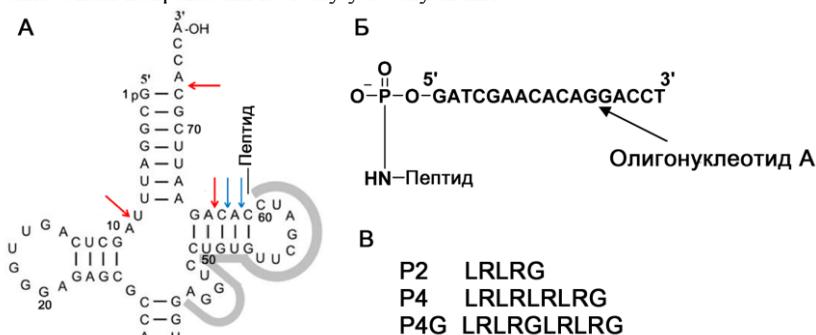


Рис. 3. Вторичная структура *in vitro* транскрипта тРНК^{Phe} и сайт связывания олигонуклеотида А (5'-GATCGAACACAGGACCT-3', серая линия). Красные и синие стрелки указывают основные и минорные сайты расщепления тРНК^{Phe} линейными ОПК, соответственно. **Б.** Общая схема строения линейных ОПК. **В.** Структура пептидов, входящих в состав ОПК.

В качестве каталитического домена ОПК были выбраны пептиды, состоящие из чередующихся остатков лейцина и аргинина, а также включающих остаток глицина: LRLRG, LRLRLRLRG, LRLRLRLRLRG, P2, P4, P4G, соответственно. Пептиды P4 и P4G были использованы в двух вариантах: с карбоксильной и амидной группой на С-конце.

2.3.2 Связывание линейных ОПК с тРНК^{Phe}

Способность конъюгатов связываться с тРНК^{Phe} исследовали методом задержки в геле (Рис. 4). Равновесные константы ассоциации для всех конъюгатов лежат в микромолярном диапазоне (Таблица 2). Полное связывание тРНК^{Phe} с конъюгатами наблюдается при концентрации конъюгата в 3-7 раз превышающей концентрацию тРНК^{Phe} (0.5 μ M). Значения K_a для связывания конъюгатов, несущих карбоксильную или амидную группу на С-конце пептида, достоверно не различаются.

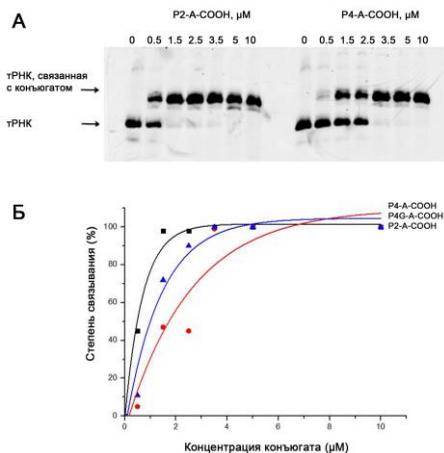


Рис. 4. Анализ связывания линейных ОПК с тРНК^{Phe}. **А.** Электрофореграмма нативного 12% ПААГ, показывающая связывание конъюгатов с тРНК^{Phe}. Название конъюгата и концентрация конъюгата указаны сверху. Стрелки показывают положение в геле тРНК^{Phe} и комплекса тРНК^{Phe}:конъюгат. **Б.** Концентрационные зависимости связывания P4-A-COOH, P4G-A-COOH и P2-A-COOH с тРНК^{Phe}.

Таблица 2. Линейные ОПК: константы связывания и степень расщепления тРНК^{Phe}.

Название	Равновесная константа связывания ¹⁾ , K_a , M^{-1}	Степень расщепления ²⁾ (24 ч, 20 μ M), %
Олигонуклеотид А	$(8.0 \pm 0.7) \times 10^6$	0
P2-A-COOH	$(1.6 \pm 1) \times 10^6$	7 \pm 2
P4-A-COOH	$(0.5 \pm 0.2) \times 10^6$	24 \pm 3
P4G-A-COOH	$(1.0 \pm 0.7) \times 10^6$	97 \pm 8
P4-A-CONH ₂	$(0.5 \pm 0.2) \times 10^6$	100 \pm 3
P4G-A-CONH ₂	$(1.0 \pm 0.7) \times 10^6$	97 \pm 2

¹⁾ K_a была рассчитана по уравнению $K_a = \alpha / ([conj](1-\alpha))$, где α - степень связывания, $[conj]$ - концентрация ОПК

²⁾ $[tRNA^{Phe}] = 1 \mu M$, $[conj] = 20 \mu M$

2.3.3 Расщепление тРНК^{Phe} линейными ОПК

Расщепление тРНК^{Phe} ОПК проводили в условиях: 37°C, 50 мМ Трис-НСl, рН 7.0; 0.2 М КСl, 1 мМ EDTA. Продукты расщепления тРНК^{Phe} разделяли в 12% ПААГ. На рис. 5 приведены примеры расщепления тРНК^{Phe} P4G-A-COОН и P4G-A-CONH₂, а также кинетики расщепления тРНК^{Phe} всеми исследованными ОПК. Не наблюдалось спонтанного расщепления тРНК^{Phe} в отсутствие ОПК в условиях реакции при инкубации в течение 24 ч. Не происходило расщепления тРНК^{Phe} в присутствии свободных олигонуклеотида А и пептида P4G.

Расщепление тРНК^{Phe} линейными конъюгатами происходит по участку С61-G65, а основным сайтом расщепления является фосфодиэфирная связь С63-А, более слабое расщепление наблюдается по связям С61-А и А62-С. Кроме того, расщеплению подвергались две связи, расположенные на расстоянии от целевого участка: U8-А и С72-А, степень расщепления тРНК^{Phe} по этим связям составляла от 20 до 40%.

2.3.4 Кинетика расщепления тРНК^{Phe} линейными ОПК

Кинетика реакции расщепления тРНК^{Phe} была исследована для всех конъюгатов серии в условиях однооборотной реакции (1 μМ тРНК^{Phe}, 20 μМ

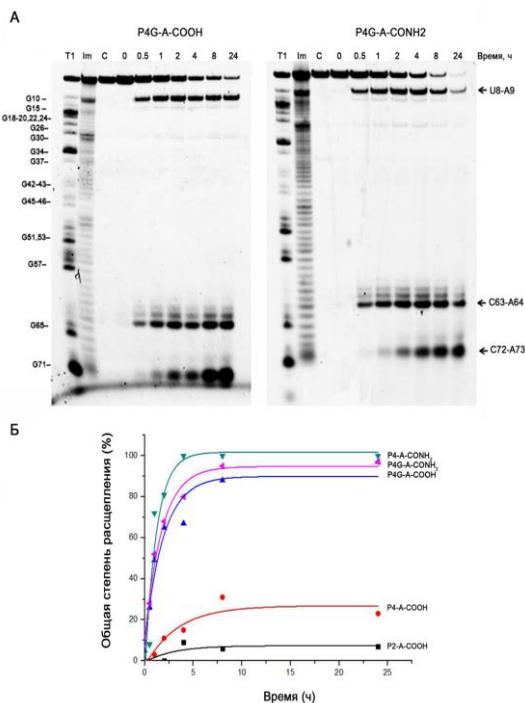


Рис. 5. Расщепление тРНК^{Phe} линейными ОПК.

А. Электрофореграмма денатурирующего 12% ПААГ, показывающая расщепление тРНК^{Phe} конъюгатами P4G-A-COОН и P4G-A-CONH₂. Название ОПК и время инкубации указаны сверху. T1 и Im, частичное расщепление тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. С, тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие конъюгатов в течение 24 ч. Сайты расщепления тРНК^{Phe} конъюгатами и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Кинетика расщепления тРНК^{Phe} линейными ОПК.

ОПК) (Рис. 5). Для P2-A-COOH общая степень расщепления тРНК^{Phe} составила 7% за 24 ч (Таблица 2, Рис. 5Б). Общая степень расщепления тРНК^{Phe} для P4-A-COOH составляла 24% за 24 ч, кривая расщепления выходит на плато через 8 ч. P4-A-COOH расщепляет тРНК^{Phe} по трем сайтам: U8A > C63A ≥ C72A. Для P4G-A-COOH, P4-A-CONH₂ и P4G-A-CONH₂ наблюдаются количественное расщепление тРНК^{Phe} за 4-8 ч. Эти ОПК расщепляют тРНК^{Phe} по основным связям U8A, C63A и C72A, а также C61A и A62C. Продукт U8 (фрагмент тРНК^{Phe} 5'-A9-A76-3', образующийся вследствие расщепления тРНК^{Phe} по связи U8-A9, здесь и далее продукт U8) появляется одновременно с продуктом C63, присутствует в реакционной смеси через 0.5 ч инкубации. Количество продукта U8 максимально через 1 ч, после чего либо остается на одном уровне (P4G-A-COOH), либо снижается до нуля (P4-A-CONH₂ и P4G-A-CONH₂).

2.3.5 Концентрационная зависимость расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COOH

На рис. 6 представлена концентрационная зависимость расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COOH. График зависимости имеет вид кривой с насыщением, кривая выходит на плато при концентрации конъюгата 10 мМ. Концентрационная зависимость расщепления тРНК^{Phe} P4G-A-COOH «запаздывает» за кривой связывания тРНК^{Phe} конъюгатом. Возможно, что ОПК при связывании с РНК не всегда образует активную конформацию, обеспечивающую расщепление. Следует отметить, что при любых концентрациях ОПК расщепления по другим связям в тРНК^{Phe} не происходит.

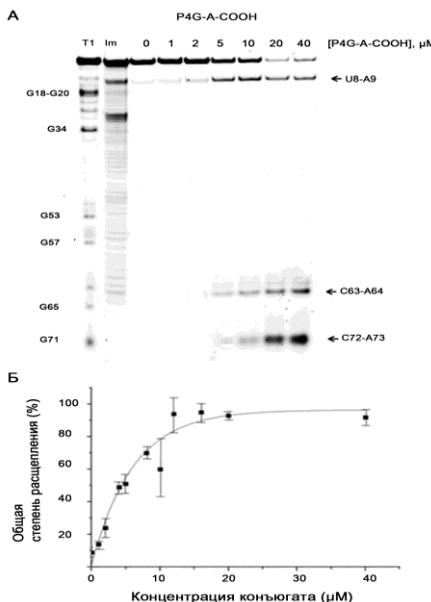


Рис. 6. Концентрационная зависимость расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COOH. **А.** Разделение продуктов расщепления тРНК^{Phe} (1μМ) в 12% денатурирующем ПААГ после инкубации при 37°C в течение 24 ч в присутствии P4G-A-COOH. Сверху указаны концентрации P4G-A-COOH. Дорожки T1 и Im, частичное расщепление тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. Сайты расщепления тРНК^{Phe} РНКазой T1 и P4G-A-COOH указаны слева и справа, соответственно. **Б.** Концентрационная зависимость расщепления тРНК^{Phe} P4G-A-COOH.

2.3.6 Влияние структуры линейных ОПК на эффективность расщепления тРНК^{Phe}

Определено два структурных элемента, оказывающих критическое влияние на рибонуклеазную активность ОПК. Первый элемент – остаток глицина, расположенный между двумя (LR)₂ мотивами. Содержащие глицин пептиды P4G-COOH и P4G-CONH₂ в составе ОПК расщепляют тРНК^{Phe} количественно, тогда как ОПК, содержащий пептид P4-COOH, проявляет значительно меньшую активность (24%). Второй элемент – карбамидная группа на С-конце пептида, введение которой позволяет повысить степень расщепления тРНК^{Phe} с 24% (P4-COOH) до 100% (P4-CONH₂).

2.4 «Двойные» конъюгаты (DC) - конъюгаты пептида с адресующими олигонуклеотидами, присоединенными к N-и С-концам пептида

2.4.1 Дизайн конъюгатов

Были изучены свойства 11 DCs (Таблица 3), направленных к участку 61-САСАG-65 тРНК^{Phe}, отличающихся структурой пептида, РНК-узнающих олигонуклеотидов и линкеров (Рис. 7). РНК-узнающие олигонуклеотиды комплементарны ТΨС-петле и аминокцепторному стеблю тРНК^{Phe}. Олигонуклеотиды были выбраны так, чтобы обеспечивать формирование одноцепочечного участка РНК-мишени длиной 5, 4 или 3 нуклеотида. В качестве каталитического домена использовали пептиды [LR]₂G, [LR]₃G, [LR]₄G (DC1-DC3, соответственно), а также пептиды с малеимидным линкером: Mal-[LR]₄G и Mal-[LRLRG]₂ (DC4-DC11).

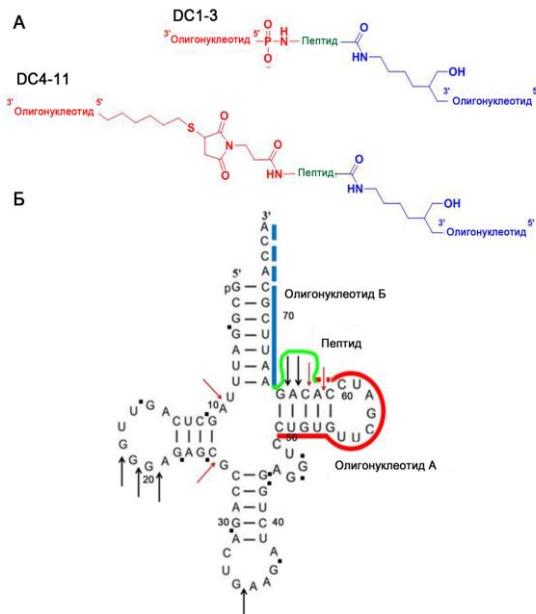


Рис. 7. А. Структура двойных конъюгатов DC1-3 и DC4-11, показывающая структуру линкеров, пептид (зеленый) и фланкирующие его адресующие олигонуклеотиды. Б. Схема взаимодействия DC с тРНК^{Phe}. Стрелками показаны основные сайты расщепления тРНК^{Phe} конъюгатами DC6 (черные) и DC7 (красные), точками – минорные сайты. Узнающие домены ОПК – олигонуклеотиды А и Б показаны красным и синим, соответственно; пептид обозначен зеленым.

2.4.2 Связывание двойных ОПК с тРНК^{Phe}

Двойные ОПК делятся на две группы по способности связываться с тРНК^{Phe}. DC1-DC7 эффективно связываются с тРНК^{Phe}. Ко второй группе относятся конъюгаты DC8-DC11, содержащие в домене Б укороченные олигонуклеотиды или олигонуклеотиды с мисматчами. Предполагалось, что такие олигонуклеотиды обеспечат слабое связывание с тРНК^{Phe}, достаточное для формирования комплекса с интактной тРНК^{Phe} и высвобождения ОПК из комплекса после расщепления. В действительности укорочение олигонуклеотидов или внесение в их последовательность мисматчей ухудшает гибридационные свойства таких конъюгатов и препятствует их связыванию с РНК-мишенью.

Таблица 3. Двойные конъюгаты (DC): номенклатура, состав, константы ассоциации (K_a) и общая степень расщепления тРНК^{Phe} в стандартных условиях.

ОПК	Пептид	Домен А	Домен Б	$K_a, 10^6 M^{-1}$	$A^1, \%$
DC1	[LR] ₂ G	GATCGAACACAG	TGGTGCGAATT	0.95±1.1	0
DC2	[LR] ₃ G	GATCGAACACAG	TGGTGCGAATT	0.91±0.9	0
DC3	[LR] ₄ G	GATCGAACACAG	TGGTGCGAATT	0.57±0.4	0
DC4	Mal- [LRLRG] ₂	GTGATCGAACACAG	TGGTGCGAATT	1.61±0.2	0
DC5	Mal- [LRLRG] ₂	GGATCGAACACA	TGGTGCGAATT	1.36±0.2	0
DC6	Mal- [LRLRG] ₂	GATCGAACACAG	TGGTGCGAATT	0.68±0.1	100
DC7	Mal- [LR] ₄ G	GATCGAACACAG	TGGTGCGAATT	0.55±0.1	40
DC8	Mal- [LRLRG] ₂	GATCGAACACAG	СТААСТ ²	Н.о. ³⁾	0
DC9	Mal- [LRLRG] ₂	GATCGAACACAG	CGAATT	Н.о.	0
DC10	Mal- [LRLRG] ₂	GATCGAACACAG	TGGTGСТААСТ ²	Н.о.	0
DC11	Mal- [LRLRG] ₂	GATCGAACACAG	TGGTGCGGGTT ²	Н.о.	0

1) Степень расщепления

2) Содержит мисматчи, выделенные курсивом

3) Не определена

2.4.3 Расщепление тРНК^{Phe} двойными конъюгатами

DC1-DC3 не расщепляли тРНК^{Phe} во всем диапазоне исследованных условий (концентрация ОПК от 1-40 μM). DC6 и DC7 эффективно расщепляют тРНК^{Phe} (Таблица 3, Рис. 8). Расщепление тРНК^{Phe} под действием DC6 происходит быстро по сравнению с другими ОПК: $\tau_{1/2} \approx 1$ ч, реакция выходит на плато к 4 ч. DC7 расщепляет тРНК с меньшей скоростью, а плато не достигается через 24 ч инкубации в присутствии конъюгата. DC6 и DC7

различаются также специфичностью расщепления РНК-мишени. Расщепление под действием DC6 происходит по связям в G-X мотивах (G20, G34, G42, G45, G65), тогда как для конъюгата DC7 характерна Руг-Х специфичность расщепления: это связи U8~C25~C63. DC6 и DC7 расщепляют РНК-мишень как во вблизи участка связывания (связи G65 и C63, соответственно), так и по связям, сближенным с участками связывания в пространстве.

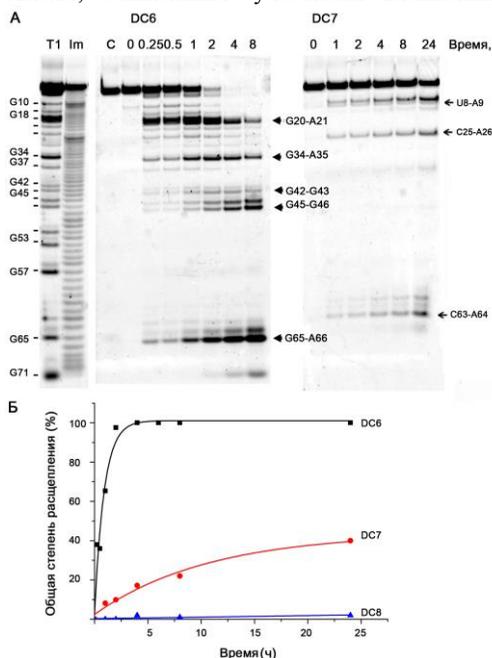


Рис. 8. Расщепление тРНК^{Phe} ОПК DC6, DC7 и DC8. **А.** Разделение продуктов расщепления тРНК^{Phe} (1 μМ) ОПК DC6 (20 μМ), DC7 (20 μМ) и DC8 (20 μМ) в денатурирующем 12% ПААГ. T1 и Im, частичное расщепление тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. С, тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие ОПК в течение 24 ч. Сайты расщепления тРНК^{Phe} ОПК и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Кинетические кривые расщепления тРНК^{Phe} ОПК DC6, DC7 и DC8

2.4.4 Влияние структуры двойных ОПК на эффективность расщепления тРНК^{Phe}

Отсутствие рибонуклеазной активности DC1-DC3 объясняется тем, что олигонуклеотид А присоединен к пептиду через фосфамидную связь. Вероятно, фосфамидный линкер в составе двойных ОПК ограничивает подвижность пептида, что делает расщепление фосфодиэфирных связей невозможным. Пептиду, ограниченному в составе двойного ОПК, требуется большая степень свободы, чем в составе линейного ОПК.

В состав DC4-DC11 был включен протяженный линкер (Рис. 7А). Способность DC6 и DC7 расщеплять РНК-мишень связана с повышением конформационной подвижности пептида, обеспеченной за счет дополнительных протяженных линкеров. Добавление глицина в структуру пептида приводит к кардинальному изменению не только степени расщепления тРНК^{Phe}, но и к изменению специфичности расщепления.

Конъюгаты DC4 и DC5 имели более длинный олигонуклеотид А (по сравнению с DC1-DC3 и с DC6-DC11). Удлинение олигонуклеотида А, входящего в состав конъюгатов DC4 и DC5 на 2 или 1 нуклеотид, соответственно, приводило к соответствующему уменьшению длины одноцепочечного участка РНК, что приводило к потере возможности расщепления. Конъюгаты DC8–DC11 имели более короткий и/или содержащий мисматчи олигонуклеотид Б (Таблица 3). Эти ОПК продемонстрировали меньше 1% расщепление тРНК^{Phe} за 24 ч.

2.4.5 Концентрационные зависимости расщепления тРНК^{Phe}

Кривые зависимости расщепления тРНК^{Phe} от концентрации имеют сигмоидный характер. Для кривых расщепления характерен лаг-период до 5 μM , когда расщепления не наблюдается (Рис. 9). Существуют два возможных сценария, объясняющих сигмоидный характер кривых и наличие лаг-периода. Согласно первому, конъюгат при образовании комплекса может принять активную или неактивную конформацию. Вторым возможным сценарием является кооперативное взаимодействие нескольких молекул конъюгата с одной молекулой тРНК^{Phe}.

2.4.6 Расщепления тРНК^{Phe} DC6 в условиях многооборотной реакции

Реакцию проводили при двукратном избытке тРНК^{Phe} над DC6 в течение 72 ч. За 24 ч степень расщепления тРНК^{Phe} достигает максимума, равного 50%. В течение дальнейшей инкубации до 72 ч не наблюдалось изменения ни

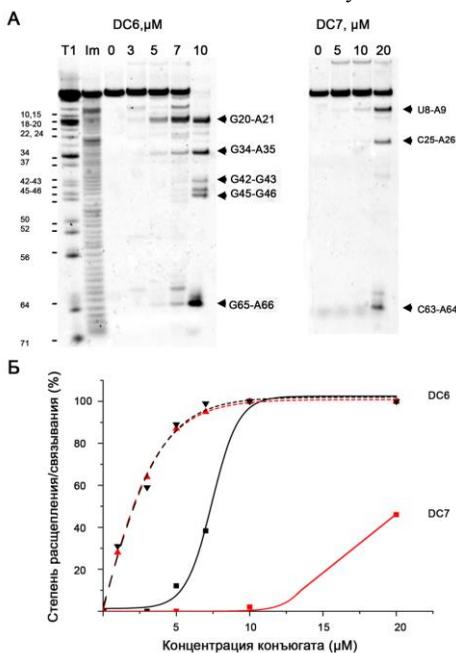


Рис. 9. Зависимость расщепления тРНК^{Phe} DC6 и DC7 от концентрации ОПК. **А.** Примеры разделения продуктов расщепления тРНК^{Phe} ОПК DC6 и DC7 в 12% ПААГ. T1 и Im, частичное расщепление тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. С, тРНК^{Phe}, инкубированная в течение 24 ч в отсутствие конъюгатов. Сайты расщепления тРНК^{Phe} ОПК и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Концентрационные зависимости связывания (пунктирная линия) и расщепления (сплошная линия) тРНК^{Phe} ОПК DC6 и DC7.

паттерна, ни степени расщепления тРНК^{Phe}. Распределение продуктов расщепления тРНК^{Phe} DC6 в условиях многооборотной реакции сходно с паттерном расщепления тРНК^{Phe} DC6 при 20-кратном избытке конъюгата за 4 ч инкубации (1 μ M тРНК^{Phe}, 20 μ M DC6). Можно предположить отсутствие действия конъюгата DC6 в каталитическом режиме. В противном случае мы наблюдали бы постепенное снижение уровня тРНК^{Phe}. Расщепление 50% тРНК^{Phe} говорит против кооперативного расщепления РНК несколькими ОПК в пользу существования активных и неактивных конформаций ОПК.

2.5 Петлеобразующие ОПК, индуцирующие формирование петли в РНК-мишени

2.5.1 Дизайн петлеобразующих ОПК

Петлеобразующие ОПК (Рис. 10) индуцируют формирование петли длиной 2-5 н в участке С61-Г65 в структуре тРНК^{Phe} при связывании с ней. Каталитический домен располагается в непосредственной близости от петли.

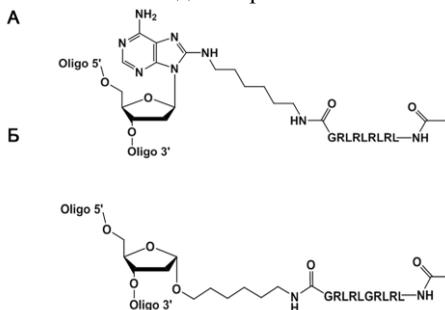


Рис. 10. Общая структура петлеформирующих конъюгатов BC2–BC5 (А) и BC2- α - BC5- α (Б), показывающая присоединение пептида к олигонуклеотиду либо через модифицированный аденозин, либо через С1' атом рибозы.

ОПК первого типа (bulge-inducing conjugates, BC) представлены серией из четырех соединений: BC2, BC3, BC4 и BC5. В позиции 12 каждого олигонуклеотида цитидин был заменен на модифицированный аденин, несущий в положении С8 аминокислотный линкер, который используется для присоединения пептида [LR]₄G-COOH.

Серия ОПК второго типа (BC- α) включает пять соединений: BC2- α , BC3- α , BC4- α , BC5- α и BC5-L- α . К рибозе апуринового/апиримидинового нуклеотида по С1'-положению присоединен аминокислотный линкер в α -конформации с пептидом [LRLRG]₂-COOH.

2.5.2 Связывание петлеобразующих ОПК с тРНК^{Phe}

Константы связывания, определенные для BC2, BC3 и BC4, примерно на порядок ниже констант связывания для линейных ОПК. Для BC5 константа связывания не была рассчитана, вследствие низкой степени связывания (Таблица 4).

Узнающий домен конъюгатов серии BC- α на 5 нуклеотидов длиннее соответствующих доменов конъюгатов серии BC. Конъюгаты BC- α связываются с тРНК^{Phe} менее прочно, чем линейные конъюгаты (Таблица 4).

Таблица 4. Петлеобразующие ОПК: обозначение, последовательность РНК-узла домена, константы ассоциации с тРНК^{Phe} (Ka).

ОПК	Олигонуклеотид (5'→3')	Ka*10 ⁶ M ⁻¹	α ³ , %
BC2	TGGTGCGAATT-A* ¹)-GTGGATCGAA	0.9±0.3	5
BC3	TGGTGCGAATT-A*-TGGATCGAA	0.5±0.1	0
BC4	TGGTGCGAATT-A*-GGATCGAA	0.4±0.2	0
BC5	TGGTGCGAATT-A*-GATCGAA		0
BC2-α	TGGTGCGAATT-dR ^{α2})-GTGGATCGAACACAG	1.9±0.6	70
BC3-α	TGGTGCGAATT-dR ^α)-TGGATCGAACACAG	1.4±0.4	100
BC4-α	TGGTGCGAATT-dR ^α)-GGATCGAACACAG	1.0±0.6	85
BC5-α	TGGTGCGAATT-dR ^α)-GATCGAACACAG	0.7±0.3	100
BC5L-α	TGGTGCGAATT-dR ^α)-GATCGAACACAGGAC	1.2±0.5	50

1) Аденозин, модифицированный аминогексильным линкером

2) Апурин/апиримидиновый сайт, к атому С1' рибозы которого присоединен аминогексильный линкер в α-конформации

3) Степень расщепления тРНК^{Phe}, 72 ч

2.5.3 Расщепление конъюгатами BC-α тРНК^{Phe}

Все ОПК BC_n не расщепляют тРНК^{Phe}. Незначительное (до 5%) расщепление модельных РНК с удлинённой до четырёх звеньев петель наблюдалось только для BC2. Напротив, все ОПК BC-α эффективно расщепляли тРНК^{Phe} (Рис. 11). При этом конъюгат BC2-α расщеплял тРНК (70%, 72 ч) только по связям вне петли. Для конъюгатов BC3-α, BC4-α, BC5-α и BC5L-α наблюдалось расщепление тРНК^{Phe} по петле, главным образом по связи C63A. Степень расщепления тРНК^{Phe} по петле составляет: 10% для BC5L-α (общая 50% за 72 ч), 33% для BC4-α (общая 85%), 65% для BC3-α и 90% для BC5-α. Для конъюгатов-лидеров BC3-α и BC5-α наблюдалось количественное расщепление тРНК^{Phe} за 48 ч. Накопление продуктов расщепления по петле продолжается после 48 ч и сопровождается деградацией фрагмента U8.

Выделено два паттерна расщепления РНК конъюгатами этой серии. BC3-α, BC4-α, BC5-α и BC5L-α помимо расщепления тРНК^{Phe} целевому участку расщепляют вне целевого участка по трем Руг-Х связям (U8A, C28A, C40A). Эти ОПК сочетают Руг-Х специфичность вне целевого участка с расщеплением 5'-CA и 5'-AC связей по петле.

Отличный паттерн расщепления характерен для BC2-α: расщепление тРНК^{Phe} вне целевого участка происходит с G-Х специфичностью. Продукты расщепления накапливаются равномерно до 72 ч инкубации без изменений паттерна, что говорит о том, что все продукты расщепления являются первичными.

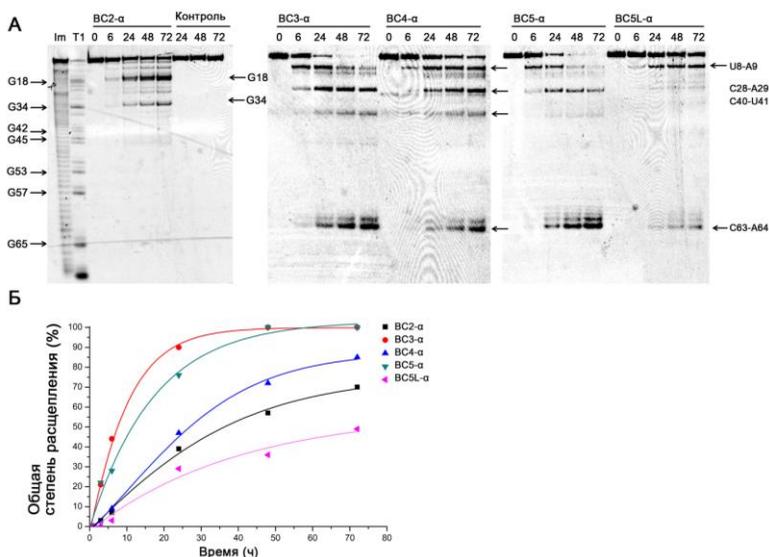


Рис. 11. Расщепление тРНК^{Phe} конъюгатами BC2-α, BC3-α, BC4-α, BC5-α, и BC5L-α. **А.** Электрофореграмма разделения продуктов расщепления тРНК^{Phe} (1 μM) BC2-α, BC3-α, BC4-α, BC5-α, и BC5L-α (20 μM) в 12% ПААГ. T1 и Im, частичное расщепление тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 M имидазольном буфере, соответственно. С, тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие ОПК в течение 24 ч. Сайты расщепления тРНК^{Phe} ОПК и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Кинетики расщепления тРНК^{Phe} BC2-α, BC3-α, BC4-α, BC5-α, и BC5L-α.

2.5.4 Концентрационная зависимость расщепления тРНК^{Phe} BC-α

Зависимость расщепления тРНК^{Phe} от концентрации конъюгата исследовали в диапазоне концентраций ОПК от 1-40 μM. Общим для всех ОПК серии BCn-α является лаг-период до 5 μM, при котором не наблюдается расщепления, но 100% РНК связано конъюгатом. Две гипотезы могут объяснить такое поведение ОПК: гипотеза активных/неактивных конформаций ОПК и гипотеза кооперативных взаимодействий ОПК.

3 Заключение

Была исследована модельная система из двух 96-звенных фрагментов РНК и олигонуклеотида-матрицы, частично комплементарного каждой из РНК, в условиях, обеспечивающих протекание спонтанной реакции трансэтерификации, катализируемой ионами Mg²⁺. Анализ полученного спектра продуктов позволил установить, что структура РНК предопределяет формирование комплексов, направляющих протекание реакции трансэтерификации по определенным участкам.

Был исследован класс РНК-направленных препаратов – ОПК, катализирующих расщепление РНК по механизму трансэтерификации.

Впервые для ОПК была продемонстрирована возможность количественного сайт-направленного расщепления модельной тРНК^{Phe}, для различных типов ОПК – линейных, двойных и петлеобразующих. Для каждого типа ОПК был проведен анализ соотношений структура-активность. Было показано, что наряду с особенностями, характерными для каждого типа, все ОПК обладают рядом общих свойств. Расщепление РНК происходит как по целевому участку, расположенному в непосредственной близости от места локализации пептида, так и по связям, сближенным с ним в пространственной структуре РНК. В целевом участке расщепление происходит по любой фосфодиэфирной связи, тогда как по связям, сближенным с пептидом в пространственной структуре происходит расщепление либо со специфичностью Руг-Х, либо G-Х, что определяется типом ОПК. Выявлена роль конформационной подвижности каталитического пептида, которая обеспечивается наличием глицина в структуре пептида и протяженными гибкими линкерами.

Таким образом, наша работа представляет шаг в развитии ОПК, а также предоставляет новые данные о влиянии структуры РНК на протекание спонтанной реакции трансэтерификации. Дальнейшее развитие работы предполагает создание ОПК, направленных на биологически значимые РНК, выбор способов доставки этих ОПК в клетки, исследование возможности инактивации РНК в культурах клеток и *in vivo*. В случае протяженных РНК-мишеней актуальным будет выбор «слабых» сайтов.

4 Выводы

Исследовано поведение модельной системы, состоящей из двух 96-звенных фрагментов вирусных РНК и олигонуклеотида-матрицы, частично комплементарного каждой из РНК, в условиях, обеспечивающих возможность протекания спонтанной реакции трансэтерификации, катализируемой только ионами Mg²⁺.

- Доказана возможность образования новых молекул РНК в результате сопряженных реакций расщепления/лигирования РНК, которые могут протекать как при участии олигонуклеотида-матрицы, так и без нее.

- Показано, что лигирование наиболее эффективно происходит в боковых и внутренних петлях длиной 1-6 н, фланкированных стабильными двуцепочечными участками.

- Показано, что формирование фрагментами РНК долгоживущих комплексов с протяженными двуцепочечными участками обеспечивает специфическое протекание реакции лигирования с образованием группы продуктов, имеющих сходную структуру, но отличающихся последовательностью в точке лигирования.

- Доказано, что наличие 5'-трифосфата на конце РНК приводит к образованию дополнительных продуктов лигирования.

- Методом молекулярного моделирования подтверждена возможность протекания спонтанной реакции трансэтерификации (лигирования) с образования 2'-5'-, но не 3'-5'-связей, для наиболее часто встречающегося продукта Pr-13.

2. Впервые продемонстрирована возможность количественного сайт-направленного расщепления модельной РНК - тРНК^{Phe} из дрожжей - линейными, двойными и петлеобразующими олигонуклеотид-пептидными конъюгатами, направленными к участку С61-С65 этой РНК, отличающимися длиной и структурой РНК-узнающего олигонуклеотида, каталитического пептида, и линкеров..

- Показано, что максимальную эффективность расщепления в составе олигонуклеоти-пептидных конъюгатов разных видов обеспечивают пептиды [(LR)₂G]₂ или (LR)₄G-NH₂. Выявлено, что наличие остатка глицина в центре пептида и/или карбамидной группы на его С-конце существенно повышает эффективность расщепления РНК:

- Показано, что для эффективного сайт-направленного расщепления РНК двойными ОПК необходимы конформационная свобода пептида, обеспечиваемая длинными подвижными линкерами и прочное связывание с РНК обоих фланкирующих пептидов РНК-узнающих доменов, расстояние между участками связывания которых должно быть не менее 5 нуклеотидов.

- Показано, что специфичность расщепления РНК двойными ОПК (Pur-A или G-X) определяется последовательностью пептида: ОПК с пептидом (LR)₄G расщепляют РНК по связям Pur-A, а с пептидом [(LR)₂G]₂ - по связям G-X.

- Показана принципиальная возможность расщепления РНК двойными ОПК с пептидом [(LR)₂G]₂ в условиях многооборотной реакции

- Показано, что для петлеобразующих ОПК положение присоединения каталитического пептида к олигонуклеотиду определяет эффективность и специфичность расщепления модельной РНК: количественное расщепление РНК наблюдается для ОПК с пептидом [(LR)₂G]₂, присоединенным к С1'-атому рибозы.

3. Показано, что реакция трансэтерификации, катализируемая ОПК различных видов, протекает как по целевому участку, расположенному в непосредственной близости от места локализации пептида, так и по связям, сближенным с ним в пространственной структуре РНК. Выявлено, что в целевом участке расщепление происходит по связям С-А, А-С и А-Г, тогда как по связям, сближенным с пептидом в пространственной структуре происходит расщепление либо со специфичностью Pur-X, либо G-X, в зависимости от вида конъюгата и последовательности пептида.

Результаты диссертации опубликованы в работах:

Статьи

1. Williams A, Staroseletz Y, Zenkova MA, Jeannin L, Aojula H, Bichenkova EV. Peptidyl-oligonucleotide conjugates demonstrate efficient cleavage of RNA in a sequence-specific manner. *Bioconjugate Chem.* 2015 Jun 17;26(6):1129-43. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00193. Epub 2015 May 21.
2. Staroseletz Y, Williams A, Burusco KK, Alibay I, Vlassov VV, Zenkova MA, Bichenkova EV. 'Dual' peptidyl-oligonucleotide conjugates: Role of conformational flexibility in catalytic cleavage of RNA. *Biomaterials.* 2017 Jan;112:44-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.033. Epub 2016 Oct 3.
3. Yaroslav Staroseletz, Sergey Nechaev, Elena Bichenkova, Richard A. Bryce, Catherine Watson, Valentin Vlassov, Marina Zenkova, Non-enzymatic recombination of RNA: Ligation in loops. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects.* 2018 Mar;1862(3):705-725. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.10.019. Epub 2017 Oct 31.

Тезисы

4. Staroselets Y.Y., Brenner E.V., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Nonenzymatic recombination of RNA: detection of novel sequences by next-generation sequencing. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33:sup1, 52-53, DOI: 10.1080/07391102.2015.1032698
5. Watson C., Staroseletz Y.Y., Zenkova M.A., Bryce R., Bichenkova E.V. Structural aspects of non-enzymatic recombination in viral RNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33:sup1, 53-54, DOI: 10.1080/07391102.2015.1032699
6. Williams A., Staroseletz Y.Y., Zenkova M.A., Bichenkova E.V. Developing a new generation of peptidyl-oligonucleotide conjugates with desired biocatalytic properties against biologically relevant RNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33:sup1, 55-56, DOI: 10.1080/07391102.2015.1032702