

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

Староселец Ярослав Юрьевич

**Спонтанная и катализируемая олигонуклеотид-пептидными конъюгатами
реакция трансэтерификации РНК**

03.01.04 –Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель
профессор, д.б.н. Зенкова М. А.

Новосибирск -2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. НАПРАВЛЕННОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ МЕТОД (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	14
1.1 Введение	14
1.2 Антисмысловые олигонуклеотиды	16
1.3 РНК-интерференция	21
1.4 Рибозимы	26
1.5 ДНКзимы	31
1.6 CRISPR Cas.....	34
1.7 Искусственные рибонуклеазы.....	36
1.7.1 Искусственные рибонуклеазы, основанные на ионах лантаноидов.....	38
1.7.2 иРНКазы, основанные на ионах Cu^{2+}	40
1.7.3 иРНКазы, основанные на ионах Zn^{2+}	41
1.7.4 Металл-независимые иРНКазы.....	42
1.7.5 Пептид-содержащие иРНКазы.....	43
1.8 Механизм расщепления РНК.....	45
1.8.1 Скорость реакции трансэтерификации и механизмы катализа	46
1.8.1.1 α -катализ	47
1.8.1.2 γ -катализ, δ -катализ и β -катализ	48
1.9 Заключение.....	51
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	52
2.1 Материалы	52
2.1.1 Реактивы.....	52
2.1.2 Праймеры и олигодезоксирибонуклеотид ON-матрица.....	52
2.1.3 Плазмиды	53

2.1.4 Растворы и буферы.....	53
2.2 Оборудование.....	55
2.3 Методы.....	55
2.3.1 Получение компетентных клеток <i>E. coli</i> штамма TOP10.....	55
2.3.3 Выделение плазмиды p67YF0, pHIV-2 или pSVK3M2.....	56
2.3.4 Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях.....	56
2.3.5 Электрофорез в агарозном геле.....	57
2.3.6 Электрофорез в ПААГ в нативных условиях.....	57
2.3.7 Линеаризация плазмид p67YF0, pHIV-2.....	57
2.3.8 Амплификация фрагмента плазмиды, содержащей pSVK3M2, содержащей последовательность M2-РНК вируса гриппа.....	57
2.3.9 Получение РНК с помощью транскрипции <i>in vitro</i>	58
2.3.10 Дефосфорилирование фрагментов РНК щелочной фосфатазой.....	58
2.3.11 Неферментативная реакция расщепления/лигирования РНК в присутствии ионов магния.....	58
2.3.12 Синтез кДНК с продуктов неферментативной реакции расщепления/лигирования фрагментов HIV-РНК и M2-РНК (обратная транскрипция).....	59
2.3.13 Амплификация продуктов обратной транскрипции.....	59
2.3.14 Частичный гидролиз ДНК в денатурирующих условиях.....	59
2.3.15 ТА-клонирование.....	60
2.3.16 Анализ рекомбинантных продуктов методом ПЦР с бактериальных колоний.....	60
2.3.17 Определение нуклеотидной последовательности участков плазмиды.....	60
2.3.19 Введение флуоресцентной метки на 3'-конец положению РНК.....	61
2.3.20 Частичный гидролиз РНК.....	61
2.3.22 Расщепление РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами.....	62
2.3.23 Расщепление РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами в условиях многооборотной реакции.....	62
2.3.24 Пробинг структуры РНК с помощью РНКазы А.....	62
2.3.25 Моделирование структуры пептида [LRLRG] ₂ с малеимидным и аминогексильным линкерами.....	63
ГЛАВА 3. СПОНТАННАЯ И КАТАЛИЗИРУЕМАЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ПЕПТИДНЫМИ КОНЪЮГАТАМИ РЕАКЦИЯ ТРАНСЭТЕРИФИКАЦИИ РНК.....	64

3.1 Рекомбинация РНК.....	64
3.1.1 Введение.....	64
3.1.2 Модельная система и условия реакции.....	65
3.1.3 Схема реакции и метод идентификация продуктов рекомбинации.....	66
3.1.4 ТА клонирование.....	71
3.1.5 Классификация рекомбинантных продуктов.....	73
3.1.6 Продукт Pr-1 (группа G0).....	73
3.1.7 Продукты G-1.....	79
3.1.8 Продукты G-2.....	79
3.1.9 Продукты G-3.....	80
3.1.10 Продукты G-4.....	80
3.1.11 Продукты G-5.....	80
3.1.12 Молекулярное моделирование продуктов группы G2.....	81
3.1.12 Паттерн расщепления РНК.....	86
3.1.13 Лигирование РНК в петлях.....	86
3.1.14 Равновесие между расщеплением и лигированием.....	89
3.1.15 Направленная рекомбинация.....	90
3.1.16 Заключение.....	91
3.2 Сайт-направленное расщепление модельной РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами различной структуры.....	92
3.2.1 Введение.....	92
3.2.2 РНК-субстраты.....	92
3.2.3 Линейные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты.....	94
3.2.3.1 Дизайн линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов.....	94
3.2.3.2 Связывание линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с тРНК ^{Phe}	95
3.2.3.3 Расщепление тРНК ^{Phe} линейными ОПК.....	97
3.2.3.4 Кинетика расщепления тРНК ^{Phe} линейными олигонуклеотид-пептидными конъюгатами.....	99
3.2.3.5 Концентрационная зависимость расщепления тРНК ^{Phe} конъюгатом P4G-A-COON.....	101
3.2.3.6 Оценка радиуса действия линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в составе комплекса с тРНК ^{Phe}	103
3.2.3.7 Влияние структуры линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на эффективность расщепления тРНК ^{Phe}	104

3.2.4 «Двойные» конъюгаты (DC) - конъюгаты пептида с адресующими олигонуклеотидами, присоединенными к N-и C-концам пептида.....	105
3.2.4.1 Дизайн конъюгатов	105
3.2.4.2 Связывание двойных конъюгатов с 3'-FITC-тРНК ^{Phe}	108
3.2.4.3 Расщепление 3'-FITC-тРНК ^{Phe} двойными конъюгатами.....	110
3.2.4.4 Влияние структуры двойных ОПК на эффективность расщепления тРНК ^{Phe}	112
3.2.4.5 Специфичность расщепления 3'-FITC-тРНК ^{Phe} конъюгатами DC6 и DC7	114
3.2.4.6 Оценка расстояний до сайтов расщепления	117
3.2.4.7 Концентрационные зависимости расщепления 3'-FITC-тРНК ^{Phe}	119
3.2.4.8 Расщепления 3'-FITC-тРНК ^{Phe} конъюгатом DC6 в условиях многооборотной реакции.....	119
3.2.4.9 Заключение	121
3.2.5 «Петлеобразующие» конъюгаты – конъюгаты пептида и адресующего олигонуклеотида, индуцирующие формирование петли в РНК-мишени.....	122
3.2.5.1 Дизайн петлеобразующих конъюгатов	122
3.2.5.2 Связывание петлеобразующих конъюгатов с тРНК ^{Phe}	125
3.2.5.3 Пробинг структуры комплекса тРНК ^{Phe} :BCn РНКазой А	126
3.2.5.4 Расщепление тРНК ^{Phe} конъюгатами BCn; роль последовательности петли	129
3.2.5.5 Расщепление конъюгатами BC-α тРНК ^{Phe}	131
3.2.5.6 Концентрационная зависимость расщепления конъюгатами BC-α тРНК ^{Phe}	134
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	136
ВЫВОДЫ.....	139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141

Список сокращений

BC – петлеобразующий конъюгат

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats

cas - CRISPR associated sequence

DC – двойной конъюгат

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

FDA - Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

FITC – флуоресцеин изотиоцианат

HDV - hepatitis delta virus ribozyme, вирус гепатита дельта

HIV – вирус иммунодефицита человека

LNA - locked nucleic acids, «заблокированные» нуклеиновые кислоты

МОЕ – метоксиэтил

miR – микроРНК

ON – олигонуклеотид

Pr - продукт

Pyr - пиримидин

siРНК – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота

TLR – toll-like receptors, толл-подобные рецепторы

VEGF - эндотелиальный фактор роста сосудов

АСО - антисмысловый олигонуклеотид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

иРНКаза - искусственная рибонуклеаза

кДНК – комплементарная ДНК

миРНК – микроРНК

ОПК – олигонуклеотид-пептидный конъюгат

ОТ – обратная транскрипция

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКаза – рибонуклеаза

РНКи – РНК интерференция

тРНК^{Phe} – фенилаланиновая транспортная рибонуклеиновая кислота

Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В процессе реализации генетической информации ключевую роль играют молекулы РНК: матричные, рибосомные, транспортные. Рибосомные и транспортные РНК являются неизменными и обязательными элементами молекулярной машины белкового синтеза. Совокупность матричных РНК определяет, какой набор белков синтезируется в данной клетке/ткани/органе. Эту упрощенную картину следует дополнить тем, что регуляция уровня мРНК, а также множества связанных процессов осуществляется с помощью разнообразных некодирующих РНК. Для примера можно указать, что, по разным оценкам, 30-60% белок-кодирующих мРНК являются мишенями для коротких некодирующих РНК, микроРНК, или миРНК [1]. Другие классы некодирующих РНК участвуют в регуляции экспрессии генов на более высоком уровне: реструктуризации хроматина [2] или инактивации X-хромосомы [3]. Некодирующие РНК участвуют также в сплайсинге, а у некоторых вирусов и в репликации генетического материала, и задействуют при этом автокаталитические механизмы. Таким образом, РНК следует рассматривать не как пассивного переносчика генетической информации от ДНК к белку, а как активного регулятора экспрессии генов.

Особенность химического строения РНК по сравнению с ДНК – наличие атома кислорода в 2'-положении рибозы – обуславливает кардинальное различие их ролей в живых организмах. Кислород в 2'-положении рибозы 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 [4]. Легкость расщепления является огромным плюсом для РНК, поскольку позволяет проводить тонкую регуляцию транскриптома, оперативно избавляясь от выполнивших свою функцию и ставших не нужными 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 разнообразных некодирующих РНК. 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. Другим типом мишени для РНК-направленных агентов являются РНК-содержащие вирусы. Эффект подавления функциональной активности РНК может быть достигнут также и без расщепления

РНК, исключительно за счет ее стерического блокирования. На практике целью часто является именно подавление функциональной активности определенной РНК, поэтому авторы в таких случаях могут оставлять открытым вопрос, произошло ли расщепление РНК или она не может выполнять свои функции вследствие стерической блокады. Ярким примером являются антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), подавляющие РНК за счет расщепления РНКазой H или за счет стерического блокирования. То же самое верно, например, для рибозимов, с той разницей, что расщепление РНК происходит за счет самого рибозима.

На данный момент существует несколько альтернативных методов селективного, или сайт-направленного расщепления РНК: РНКаза H в присутствии АСО, siРНК, рибозимы, РНКза Р в сочетании с АСО, ДНКзимы и искусственные рибонуклеазы (иРНКазы). Все эти методы начали разрабатываться в разное время, соответственно, сейчас находятся на разных стадиях развития. Первым по времени был предложен метод АСО, и к настоящему моменту существуют четыре медицинских препарата, одобренных FDA, действующих по этому принципу, а также два одобренных FDA препарата на основе siРНК, тогда как препараты на основе рибозимов и ДНКзимов находятся на разных стадиях клинических испытаний. Что касается иРНКаз, то на их основе не создано ни одного препарата, который дошел хотя бы до клинических испытаний. Долгое время большинство исследований были посвящены металл-содержащим иРНКазам, использующим в качестве катализатора ионы лантаноидов, меди или цинка. Однако неизбежная потеря иона делает такие иРНКазы потенциально токсичными, поскольку катализатор – ион металла начинает действовать не селективно, на любые РНК. иРНКазы, не содержащие ион металла, в качестве катализатора используют различные органические группы, такие как имидазольная, гуанидиновая и другие. В качестве каталитической группы большой интерес представляют пептиды из чередующихся остатков гуанина и лейцина, способные с высокой эффективностью расщеплять фосфодиэфирные связи, действуя в составе олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК), содержащих олигонуклеотид, комплементарный РНК. На данный момент не создано иРНКаз сайт-направленного действия на основе таких пептидов, однако это представляется не только возможным, но и необходимым. Предположительно, можно ожидать повышение эффективности подавления РНК в клетке под действием таких иРНКаз по сравнению с АСО, поскольку в дополнение к блокированию РНК и ее расщеплению РНКазой H будет добавлено расщепление ее каталитическим пептидом. Не исключено также синергическое действие каталитического пептида в составе конъюгата и РНКазы H за счет того, что РНКаза H препятствует взаимодействию каталитического пептида с дуплексом РНК:ДНК и, таким образом, «вынуждает» пептид взаимодействовать с одноцепочечными участками РНК, по

которым может произойти расщепление. Таким образом, создание ОПК сайт-направленного действия представляет интерес в качестве пути увеличения эффективности существующих способов селективного расщепления РНК.

Одним из важнейших факторов, определяющих способность ОПК или любого другого агента сайт-направленно расщеплять РНК, является выбор сайта расщепления. Необходимо учитывать, что скорость расщепления РНК по различным связям (здесь и далее имеются в виду межнуклеотидные фосфодиэфирные связи, если не указано иное) может отличаться в 10^4 раз, что определяется вторичной и третичной 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 самых общих закономерностей протекания реакции трансэтерификации РНК, выявления зависимости скорости расщепления по определенному сайту в зависимости от прилегающих нуклеотидов, а также от вторичной и третичной структуры РНК. Одним из вариантов выявления таких закономерностей является исследование некатализируемой спонтанной реакции трансэтерификации в разных сайтах произвольной молекулы РНК, обладающей различными элементами вторичной и третичной структуры.

Цели и задачи исследования

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 полученных результатов

В рамках 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. Впервые 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.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Автором показана обусловленность протекания спонтанной реакции трансэтерификации РНК вторичной и третичной структурой РНК. Показано, что стабильные двуцепочечные комплексы РНК могут направлять реакцию трансэтерификации по определенным участкам РНК. Показано, что спонтанная реакция трансэтерификации РНК протекает преимущественно в боковых и внутренних петлях.

Сайт-направленное расщепление РНК с помощью ОПК слабо исследовано по сравнению с альтернативными методами сайт-направленного расщепления РНК. При этом использование ОПК в качестве РНК-расщепляющих агентов сайт-направленного действия потенциально более эффективно, чем использование других агентов.

Автором показана принципиальная возможность создания на основе ОПК РНК-расщепляющих агентов сайт-направленного действия. Продемонстрирована возможность использования трех кардинально отличающихся структур ОПК: линейные, двойные и петлеобразующие ОПК. Доказано, что все три схемы дизайна могут быть использованы для создания ОПК, эффективно расщепляющих РНК. Показано, что расщепление РНК наблюдается как по целевому сайту расщепления, так и вне его по нескольким сайтам, сближенным в пространстве с каталитическим пептидом.

Основные 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 $(LR)_4GNH_2$ 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 Рур-Х, либо с G-Х специфичностью, определяемой структурой ОПК.

Апробация работы и публикации

По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS. Результаты работы были представлены на 4 российских и международных конференциях.

Личный 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.

Идеологическое планирование работы проведено совместно с д.б.н., профессором Зенковой М.А (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

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

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).

Объем и структура диссертации

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.

Глава 1. Направленное расщепление РНК как терапевтический метод (Литературный обзор)

1.1 Введение

За последние 30 лет представления о РНК радикально изменились. Во времена, когда были известны только матричные, транспортные, рибосомальные и вирусные РНК, РНК приписывалась функция не более чем посредника между ДНК и белками в процессе реализации генетической информации. Накапливающиеся открытия заставили в корне пересмотреть эту точку зрения. Выяснилось, что РНК является абсолютно необходимым компонентом в системе регуляции реализации генетической информации [5–8]. Многочисленные новые классы некодирующих РНК, такие как длинные некодирующие РНК, микроРНК (миРНК), малые интерферирующие (siРНК), малые ядерные РНК (мяРНК), рiРНК оказались вовлечены в регуляцию самых разнообразных процессов: реструктуризацию хроматина [2,9], инактивацию мРНК [10,11], подавление ретротранспозонов [12], сплайсинга [13] и многих других. Более того, функции значительной части транскриптома до сих пор не идентифицированы, что позволяет ожидать открытия новых РНК или новых функций РНК. Таким образом, РНК - это универсальная молекула, участвующая во всех этапах реализации генетической информации, выполняющая разнообразные функции, среди которых следует подчеркнуть регуляторную роль РНК. Путем воздействия на определенную РНК возможно произвести «точечное», селективное воздействие на клетку. Для практической реализации этой возможности требуется создание агентов, способных сайт-направленно расщеплять выбранную РНК, а селективность воздействия может быть обеспечена за счет включения в состав такого агента последовательности, комплементарной выбранной РНК.

Наибольший интерес представляет применение таких агентов для изменения паттерна экспрессии генов, а также в качестве противовирусных [14] и антибактериальных [15] препаратов. В отличие от большинства используемых сегодня лекарственных препаратов, действующих на белки, преимущественно ферменты или рецепторы [16,17], РНК-направленные агенты опосредованно меняют уровень соответствующего белка, снижая уровень соответствующей матричной РНК (антисмысловые олигонуклеотиды) или, например, миРНК (антагомиры) [16,18–20].

Препараты, действующие на уровне РНК, имеют ряд преимуществ по сравнению с лекарствами, действующими непосредственно на белки. Во-первых, действуя на РНК можно регулировать экспрессию почти любого гена. В случае белков требуется подобрать препарат, с высокой специфичностью взаимодействующий только с данным белком-мишенью, что

зачастую затруднительно, а в некоторых случаях невозможно [17]. Далее, подбор препарата, действующего на белок, на порядки более трудоемкий, чем выбор последовательности, комплементарной РНК-мишени, хотя и при решении этой задачи встречаются определенные трудности. Во-вторых, действуя на РНК, экспрессию гена-мишени можно как подавлять, так и усиливать [16,18]. Такая возможность отсутствует для большинства, хотя и не для всех, действующих на белки препаратов [17].

Таким образом, регуляция экспрессии генов с помощью РНК-направленных агентов представляет собой перспективный терапевтический подход. Среди таких агентов наибольший интерес для нас представляют искусственные РНКазы (иРНКазы) сайт-направленного действия, тем не менее, представляется интересным сделать обзор альтернативных методов сайт-направленного расщепления РНК. С одной стороны, это позволит оценить преимущества и недостатки различных агентов в сравнении с иРНКазами, с другой, все подходы, связанные с направленным действием на РНК, имеют ряд общих нерешенных проблем, таких как доставка в клетки, защита от рибонуклеаз, токсичность и т.д.

Исторически первый способ подавления функциональной активности определенной РНК – использование антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), которые при связывании с РНК либо обеспечивают ее расщепление под действием РНКазы Н, либо, при связывании с определенными участками РНК, препятствуют кэпированию, полиаденилированию, сплайсингу или трансляции [21–23]. Перспективным представляется использовать для «уничтожения» выбранной РНК механизм, созданный для этой цели эволюцией – РНК интерференцию, запускаемую либо малыми интерферирующими РНК (siРНК) [24,25], либо, альтернативно - микроРНК [26,27]. Другими агентами, способными селективно расщеплять РНК, но не использующими внутриклеточных ферментов являются рибозимы, иРНКазы и ДНКзимы. Иногда ДНКзимы модифицируют расщепляющими агентами, такими как имидазол, в этом случае их скорее можно отнести к иРНКазам [28]. Особняком стоят методы фотоиндуцированного расщепления РНК.

Спектр применения таких РНК-расщепляющих агентов не ограничивается регуляцией экспрессии генов. Они также могут быть удобным молекулярно-биологическим инструментами: в синтетической биологии [29], «эндонуклеазами рестрикции» для РНК [30] для изучения структуры РНК или РНК-белковых взаимодействий [31]. в качестве компонентов биосенсоров [32].

Отдельной проблемой, касающейся сайт-направленного расщепления РНК, является выбор сайта расщепления. Вторичная и третичная структура РНК, а также образование в клетке нуклеопротеидных комплексов в значительной степени определяют возможность расщепления

РНК по определенному сайту, причем в некоторых случаях расщепление полностью блокируется. Существует несколько стратегий подбора подходящих для расщепления участков РНК [33]. Оставляя за рамками вопрос влияния белков, связывающихся с РНК, на вероятность ее расщепления, мы сделали попытку связать вероятность расщепления РНК с ее структурой.

Таким образом, главной задачей данного обзора является проследить развитие и обрисовать современное состояние терапевтических подходов, основанных на сайт-направленном расщеплении РНК. Второй задачей является исследование факторов, влияющих на эффективность расщепления фосфодиэфирной связи в РНК.

1.2 Антисмысловые олигонуклеотиды

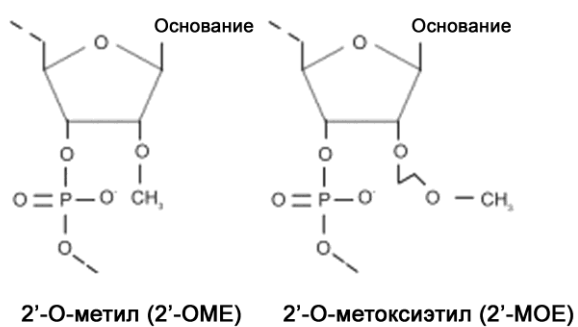
Идея селективного воздействия на РНК с использованием антисмысловых олигонуклеотидов была предложена в работах [34–36] и реализована сначала в бесклеточной системе [37], а чуть позже для подавления вируса саркомы Рауса, причем 13-звенный АСО, комплементарный концевым повторам вируса саркомы Рауса, подавлял как репликацию вирусной РНК [38], так и трансляцию вирусных белков [39]. Концепция избирательной инактивации РНК получила экспериментальное подтверждение, однако прежде чем применять ее в терапии или для исследования функций РНК, требовалось решить ряд проблем. ДНК оказалась неподходящим материалом для АСО вследствие быстрого расщепления клеточными нуклеазами: так, в сыворотке крови период полужизни ($\tau_{1/2}$) олигодезоксинуклеотида составляет, по разным данным, от 10 мин до 1,5 ч [40]. Возникла необходимость разработки аналогов, устойчивых к действию нуклеаз. Созданные к настоящему моменту аналоги чаще всего объединяют в три поколения, хотя и несколькими различными способами [21,23,41,42].

Среди АСО первого поколения известны ДНК аналоги, у которых один из атомов кислорода заменен на метильную группу (метилфосфонат) или 3'-кислород заменен на аминогруппу (амидофосфаты) (Рис. 1) [21]. Однако, наиболее широко применяются тиофосфатные АСО (Рис. 1), у которых несвязывающий атом кислорода заменен на атом серы [43]. Большинство олигонуклеотидов первого поколения, находящихся в клинических испытаниях, а также единственный из них, одобренный FDA (Fomivirsen) [44], являются фосфотиоатными АСО [21,23,41]. По сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами фосфотиоатные АСО лучше защищены от нуклеаз ($\tau_{1/2} = 9-10$ ч), более эффективно проникают в клетки, вероятно, за счет лучшего связывания с рецепторами вследствие изменения заряда. При этом при связывании с РНК они образуют дуплекс, являющийся субстратом РНКазы Н. Кроме того, более прочное связывание с белками плазмы крови снижает скорость их выведения из организма [41,45].

Первое поколение АСО



Второе поколение АСО



Третье поколение АСО



Четвертое поколение АСО

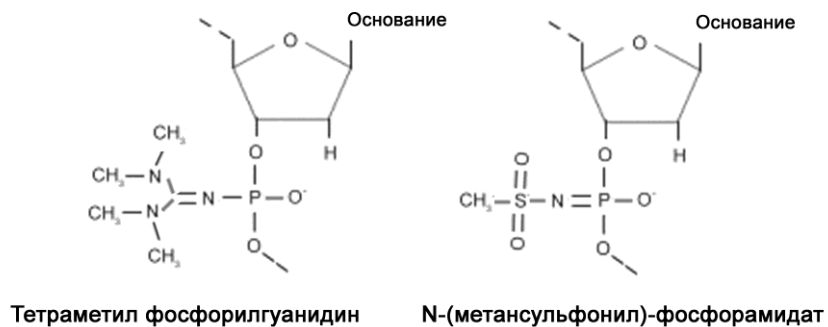


Рис.1. Химические модификации, применяемые в АСО

Тем не менее, тиофосфатные АСО не лишены недостатков, что стимулирует поиск других модификаций. Так, эффективность связывания с мишенью снижена: температура плавления дуплекса с РНК, образованного тиофосфатными АСО на 0,5 °С ниже, чем дуплекса РНК:ДНК [46]. Главным же недостатком тиофосфатных АСО являются побочные эффекты, вызванные неспецифическим связыванием с различными, например, гепарин-связывающими белками [47]. Обычно в низких дозах они не токсичны, но иногда наблюдались такие эффекты как увеличение времени свертывания крови, активация иммунного ответа, тромбоцитопения [16,21,47,48].

Ко второму поколению АСО относятся олигонуклеотиды с алкильными модификациями по 2'-положению рибозы, самые распространенные из которых - 2'-О-метил (2'-ОМЕ) и 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ) АСО (Рис. 1) [49]. Проблема данной группы АСО в том, что они не обеспечивают расщепление РНК РНКазой H, вследствие чего эффект ингибирования функциональной активности РНК снижается [21,23,41,42,47]. Чтобы преодолеть это затруднение, были предложены химерные АСО-«гапмеры», центральная часть которых, состоящая из фосфоротиоатных нуклеотидов, фланкирована соединенными фосфоротиоатными связями 2'-О-модифицированными рибонуклеотидами [21,23,41,46]. Фосфоротиоатный фрагмент обеспечивает активацию РНКазы H, благодаря 2'-О-метильным модификациям АСО лучше связываются с мишенью, более устойчивы к нуклеазам ($\tau_{1/2} = 12$ ч) и менее токсичны по сравнению с АСО первого поколения [21,23,41,42,47,50]. Примерами препаратов такого типа, одобренных FDA, являются Mirumersen [50,51] и Nusinersen [52,53].

Среди АСО третьего поколения наибольшее распространение получили модификации трех типов: «заблокированные» нуклеиновые кислоты (LNA, locked nucleic acids), пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA, Peptide nucleic acid) и морфолино фосфорамидаты (MF, Morpholino phosphoramidates) (Рис. 1) [21,23,47]. Преимуществами АСО третьего поколения являются большая эффективность гибридизации с комплементарной последовательностью РНК, по сравнению с немодифицированной ДНК [23] и высокая устойчивость к нуклеазам [21,23]. Однако такие АСО также не способны «рекрутировать» РНКазу H, поэтому они используются в форме молекул-«гапмеров», или их активность обусловлена другими механизмами (стерическим блокированием трансляции) [40]. Вследствие пониженного (по модулю) или отсутствующего отрицательного заряда такие АСО не связываются белками сыворотки, обычно связывающими фосфоротиоатные олигонуклеотиды. С одной стороны, это уменьшает вероятность неспецифических взаимодействий, с другой – ускоряет их выведение из организма [21,54]. Кроме того, отсутствие заряда уменьшает их растворимость. Тем не менее, в ряде исследований было показано подавление экспрессии целевых генов и замедление роста

опухоли с помощью АСО третьего поколения [55–57]. При этом тестируемые соединения продемонстрировали низкую токсичность и отсутствие побочных эффектов. Один MF-АСО – Eteplirsen – одобрен FDA в 2016 г по процедуре ускоренного одобрения, предполагающей впоследствии дополнительную серию испытаний [52].

Поиск новых модифицированных аналогов нуклеиновых кислот продолжается. В качестве примера можно привести фосфорилгуанидиновые [58] и мезилфосфорамидные олигодезоксинуклеотиды [59,60] (Рис. 1), обладающие чрезвычайно высокой нуклеазоустойчивостью. Так, если время полужизни PS-АСО в 50% сыворотке составляет 10 ч, то время полужизни фосфорилгуанидиновых АСО в тех же условиях больше 21 суток (Черников И. В., неопубликованные данные). Мезилфосфорамидный олигодезоксинуклеотид оставался интактным в 10% сыворотке в течение 7 суток, тогда как концентрация PS-АСО в 10% сыворотке за 4 суток уменьшилась вдвое [60].

Инактивация целевой РНК за счет АСО происходит по нескольким механизмам, важнейшим из которых является активация РНКазы Н, которая расщепляет РНК в ДНК-РНК дуплексах [61,62]. АСО после расщепления РНК остается интактным и может связываться с другими молекулами-мишенями [41]. Такой механизм обеспечивает долговременный эффект от АСО и позволяет использовать их в субмикромольных концентрациях. За счет активации РНКазы Н в отдельных случаях достигается 85-95% снижение уровня экспрессии целевого гена [21]. Ранее считалось, что РНКазы Н локализована преимущественно в ядре [63], однако по последним данным, РНКазы Н работает в ядре, цитоплазме и митохондриях [22,64], благодаря чему возможна адресация АСО практически к любым РНК.

Расщепление РНКазой Н – не единственный механизм, обеспечивающий инактивацию целевой РНК [21,61]. Например, АСО могут конкурировать с мРНК за связывание с миРНК, нейтрализуя действие последней [65]. Связываясь с мРНК, АСО препятствует связыванию с ней факторов трансляции, рибосом [57], могут препятствовать кэпированию [66] или полиаденилированию [67] мРНК, нарушая ее транспорт из цитоплазмы [61], а также изменять ход сплайсинга, индуцируя синтез альтернативных вариантов мРНК. Так действует, в частности, препарат Eteplirsen [68]: индуцируя пропуск 51-ого экзона гена дистрофина, восстанавливает рамку считывания, что приводит к синтезу функционального белка [52].

Еще одна проблема, связанная с АСО - их проникновение в клетку [21]. Подробное рассмотрение этого вопроса выходит за рамки данного обзора, и здесь мы только перечислим несколько используемых подходов. Доставка АСО в клетки *in vitro* и *in vivo* кардинально различается. Если в большинстве исследований *in vitro* требуются какие-либо средства доставки, то *in vivo* в некоторых случаях можно обойтись без них [69]. Хотя в ряде

исследований показано связывание АСО с белками плазмы крови, действительно эффективных «доставщиков», действующих *in vivo*, пока не найдено [69].

В качестве средств доставки *in vitro* очень эффективны катионные липосомы, такие как Lipofectamine [21], главными недостатками которых, препятствующими использованию их *in vivo*, являются токсичность и нестабильность в сыворотке [70,71]. Создано несколько вариантов липосом со сниженной токсичностью [72] или повышенной устойчивостью в плазме и сыворотке [73–75]. Есть примеры успешного использования АСО в сочетании с липосомами *in vivo* [76]. Альтернативой катионным липосомам являются ковалентно присоединенные к АСО положительно заряженные пептиды [77], N-ацетилглюкозамин [78], дендримеры [79], конъюгаты АСО с полиэтиленгликолем и холестерином [80,81]. В *in vitro* исследованиях чрезвычайно полезными могут быть механические методы введения, такие как микроинъекции и электропорация [23].

АСО представляют собой первый по времени появления и, пожалуй, наиболее разработанный на данный момент способ сайт-направленного воздействия на РНК. По состоянию на февраль 2019 имеется пять препаратов на основе АСО, одобренных FDA (Таблица 1) [52,82]. Существуют также два одобренных FDA препарата на основе олигонуклеотидов, Masugen и Defitelio, действующих не по принципу АСО, соответственно, они не рассматриваются в данном обзоре [52,82]. Так, Masugen является аптамером и действует не на бессмысловую РНК, а на белок VEGF. Первым принятым препаратом является Formivirsen (1998), направленный против мРНК ключевого гена цитомегаловируса человека [52]. Одобренный в 2013 г Mirumersen направлен против мРНК гена ApoB [41]. Недавно одобренные (2016) препараты Nusinersen и Eteplirsen используют механизм переключения сплайсинга, индуцируя образования альтернативных вариантов мРНК генов SMN1 и DMD (дистрофина), соответственно [52]. Последним по времени одобрения препаратом является Inotersen (Tegsedi), ингибитор экспрессии транскриптаза, мутантные формы которого вследствие неправильного фолдинга образуют амилоидные фибриллы, что приводит к транскриптинговой амилоидной полиневропатии [83]. Кроме того, десятки препаратов находятся в разработке или на разных стадиях клинических испытаний. Так, компания Ionis Pharmaceuticals, специализирующаяся на АСО, на данный момент работает над 38 олигонуклеотидами [22]. Этот факт, а также создание новых нуклеазоустойчивых аналогов олигонуклеотидов, позволяют ожидать появления новых основанных на АСО лекарственных препаратов.

Таблица 1. Одобренные FDA препараты на основе модифицированных олигонуклеотидов.

Название	Заболевание	Одобен, год	Длина, н	Модификации	Ссылки, примечания
Fomivirsen (Vitravene)	Цитомегаловирусный ретинит	1998	21	PS	[44,52]
Mipomersen (Kynamro)	Гиперхолестеринемия	2013	20	PS, 2'-ОМОЕ	[51,52]
Nusinersen (Spinraza)	Спинальная мышечная атрофия	2016	18	2'-ОМОЕ	[52,53]
Eteplirsen (Exondys 51)	Мышечная дистрофия Дюшенна	2016	30	MF	[52,68] Ускоренное одобрение
Tegsedi (Inotersen)	Транстиретиновая семейная амилоидная полиневропатия	2018	20	2'-ОМОЕ	[83]

1.3 РНК-интерференция

РНК-интерференция (РНКи) – это эволюционно консервативный механизм регуляции экспрессии генов и защиты клетки от чужеродной РНК, опосредованный короткими регуляторными РНК [84]. Впервые механизм РНКи был описан в 1998 у нематоды *Caenorhabditis elegans* [85]. Длинные дцРНК расщепляются клеточной рибонуклеазой Dicer с образованием siРНК (small interfering RNA, малые интерферирующие РНК): РНК дуплексов длиной 21-25 п.н. со свисающими двунуклеотидными 3'-концами. siРНК взаимодействуют с клеточными белками, формируя комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), включающий одну из цепей siРНК («направляющую», или антисмысловую цепь) и белок Argonaute (Ago2), обладающий рибонуклеазной активностью. Комплекс RISC способен селективно расщеплять мРНК, причем узнавание определенной мРНК обеспечивает направляющая цепь siРНК, а ее разрезание – белок Ago2 [84–86]. Для эффективной работы РНКи необходима полная комплементарность направляющей цепи siРНК и РНК-мишени.

В клетках млекопитающих возможно инициировать РНК интерференцию, используя искусственные аналоги siРНК [87], а также короткие шпилечные РНК (short hairpin RNA, shРНК) [88,89], РНК субстрат Dicer (dsiРНК) [86,90]. Кроме того, для расщепления выбранной мРНК можно использовать микроРНК (миРНК) [86,91,92]. миРНК – это короткие некодирующие РНК длиной 18-25 н, участвующие в регуляции экспрессии генов. В отличие от siРНК, миРНК формирует с РНК-мишенью несовершенный дуплекс, содержащий мисматчи и

петли, вследствие чего одна миРНК часто участвует в регуляции экспрессии нескольких генов [86]. По разным оценкам, от 30% до 60% генов человека регулируются на посттранскрипционном уровне помощью миРНК [93,94]. Зрелая миРНК включается в комплекс RISC, однако миРНК-опосредованная РНКи индуцируется только в случае полной комплементарности миРНК и РНК-мишени. В большинстве случаев подавление экспрессии гена посредством миРНК происходит на уровне трансляции, т.е. мРНК не разрушается [92,95]. ShРНК и dsiРНК – это искусственные РНК, которые под действием клеточных ферментов превращаются в siРНК [86]. Все перечисленные классы РНК могут быть использованы для подавления экспрессии целевого гена с терапевтическими или исследовательскими целями (Рис. 2).

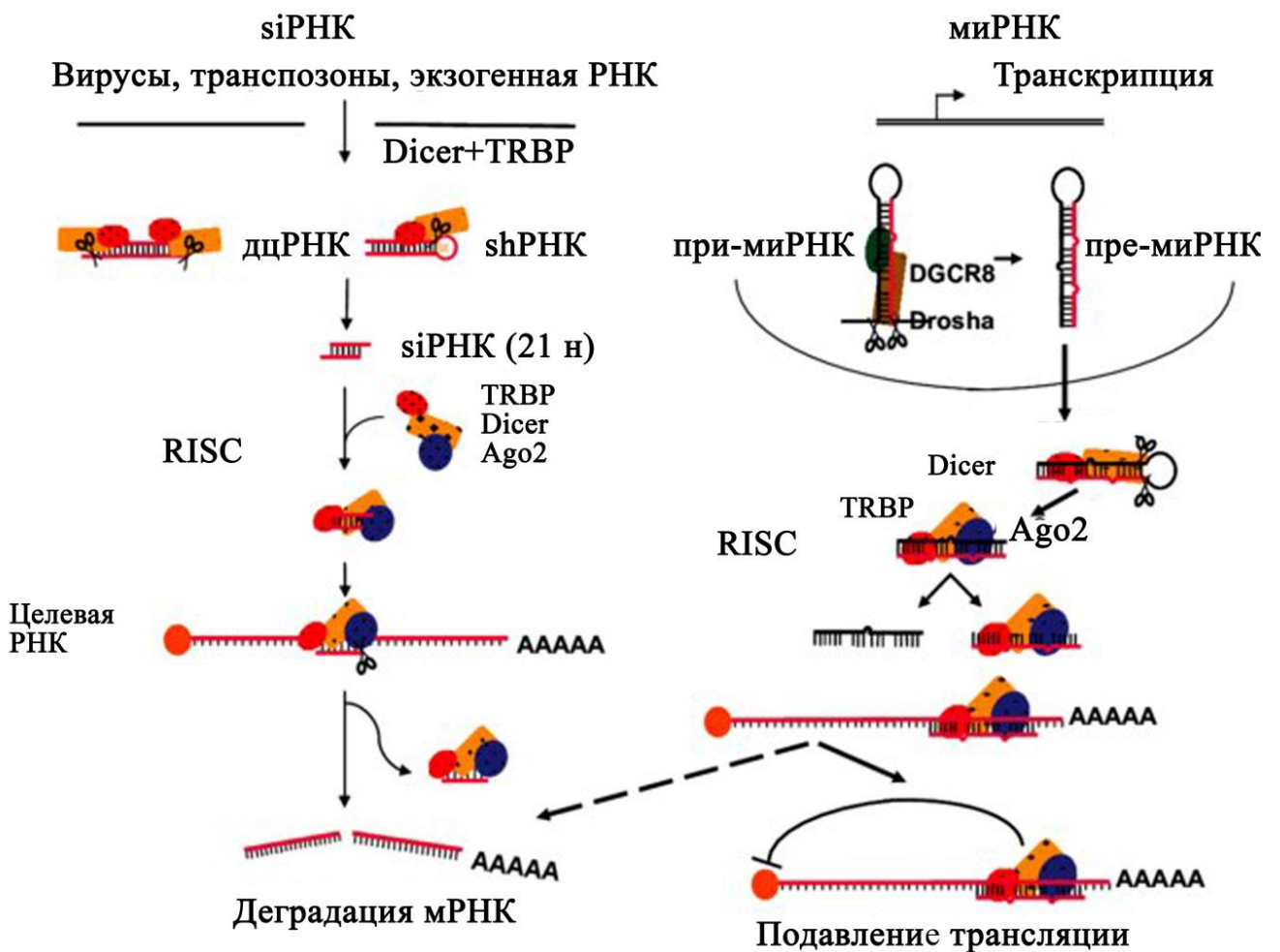


Рис. 2. Использование РНКи для подавления мРНК. shРНК или пре-миРНК доставляются в клетку с помощью плазмидного или вирусного вектора, транскрибируются в ядре и далее экспортируются в цитоплазму. Экзогенная или эндогенная dsiРНК или shРНК процессируется белком Dicer при участии TRBP (TAR RNA binding protein) с образованием siРНК, которая встраивается в комплекс RISC, включающий в состав рибонуклеазу Ago2. Альтернативно, экзогенная siРНК или миРНК встраивается в RISC, индуцируя РНКи в случае siРНК или блокирование трансляции в случае миРНК [96].

При использовании любой из перечисленных РНК в качестве терапевтического препарата требуется решить следующие проблемы: чувствительность к нуклеазам, доставка в клетки, время выведение из организма, а также возможные побочные эффекты [84,86]. Существует несколько факторов, за счет которых siРНК могут вызывать побочные эффекты в организме: 1) активацией иммунного ответа 2) включением в RISC «пассажирской» цепи вместо направляющей 3) подавлением мРНК вследствие действия siРНК по механизму миРНК [84,97]. Активация иммунного ответа дцРНК длиной более 30 п.н. описана давно [98]; короткие (20 п.н. и более) дцРНК также могут активировать иммунный ответ [99,100]. Механизм этого процесса сложен и вовлекает различные TLRs (toll-like receptors, толл-подобные рецепторы) [101], а также ряд других белков (OAS, PKR, RIG-1, Mda 5) [102]. Избежать активации нежелательного иммунного ответа можно путем использования модифицированных аналогов siРНК. В настоящем обзоре мы не ставим целью рассмотреть все возможные модификации, используемые для этой цели (подробно описаны, например, в обзорах [84,103]), отметим только основные моменты.

Тип, число и расположение модификаций должны быть подобраны так, чтобы не нарушать связывание направляющей цепи siРНК с комплексом RISC и одновременно препятствовать взаимодействию с TLR-рецепторами. Например, для siРНК, направленной против вируса гепатита В, удалось снизить до минимума иммунный ответ *in vivo*, заменив 90% нуклеотидов на 2'-фтор, 2'-метокси и 2'-дезоксидеозиды аналоги [104,105]. В некоторых случаях для достижения подобного эффекта достаточно введения в siРНК двух модифицированных звеньев [106,107].

Селективная модификация siРНК позволяет добиться снижения эффектов, обусловленных связыванием с нецелевыми мРНК. В этом отношении важен «seed region» siРНК – основания со 2 по 8 н с 5'-конца направляющей цепи, замена в котором всех звеньев на дезоксианалоги [108] или введение одиночной 2'-ОМе модификации во втором положении [109] существенно снижает связывание такой siРНК с нецелевыми мРНК. Что касается проблемы выбора цепи или, другими словами, преимущественного включения в RISC «направляющей» цепи, то в общем случае проблема решается изменением термодинамической асимметрии РНК-дуплекса [84]. Альтернативный подход заключается в использовании sisiРНК (sisiRNA, small internally segmented interfering RNA, малая сегментированная интерферирующая РНК), «пассажирская» цепь которой состоит из двух фрагментов и в RISC встраиваться не способна [110,111].

В клетке siРНК быстро разрушается под действием 3'-экзонуклеазы ERI-1, вероятно, отщепляющей свисающие 3'-концы [112], или эндонуклеаз, сходных с РНКазой А [113].

Описано множество модификаций, в том числе по 2'-положению рибозы, по 5'-концевому или межнуклеотидному фосфату, по 3'-свисающим концам, способных повысить устойчивость siРНК к нуклеазам [84]. Существует две основные стратегии использования модификаций. Первая предполагает введение модификаций по каждой позиции siРНК, что позволяет получить siРНК с $\tau_{1/2}$ =2-3 суток по сравнению с $\tau_{1/2}$ =3-5 минут у немодифицированных аналогов [105]. Однако модифицированные таким образом siРНК во многих случаях теряют полностью или частично интерферирующую активность. Более выигрышной является стратегия картирования нуклеазочувствительных сайтов с последующей их модификацией [114] в комплексе с защитой 3'-концов [115] и учетом термодинамической асимметрии дуплекса [111]. Такой подход позволяет получить долгоживущую siРНК, сохраняющую способность индуцировать РНКи.

Доставка РНК в клетки может осуществляться с помощью всех методов, описанных для АСО, а также с использованием плазмидных или вирусных векторов (shРНК) [89].

Возможность применения siРНК и других индуцирующих РНК-интерференцию РНК в терапевтических целях была подтверждена экспериментально впервые в 2003 г, когда с помощью инъекций направленной против мРНК гена *Fas* siРНК удалось продлить с 3 до 10 дней жизнь мышам, больным аутоиммунным гепатитом [116]. На данный момент больше 20 siРНК, а также miРНК, shРНК, dsiРНК находятся на разных стадиях клинических и доклинических испытаний (Таблица 2) [86,117,118].

Некоторые miРНК, такие как miR-34a, miR-16, let-7, участвуют в регуляции пролиферации клеток, и нарушение их экспрессии приводит к развитию опухоли [119]. Доставка экзогенной miR-34a в различные типы опухолей значительно замедляет их рост, однако в клинических испытаниях были выявлены токсические эффекты miR-34a, что привело к завершению испытаний препаратов этих miРНК после фазы I в 2016 г. Других miРНК в клинических испытаниях на данный момент нет [82].

Среди препаратов siРНК можно назвать Bevasiranib, представляющий собой немодифицированную siРНК, направленную против VEGF. В настоящее время препарат находится на третьей фазе клинических испытаний [120].

Первый и единственный на данный момент (февраль 2019) одобренный FDA препарат на основе РНКи – это Patisiran (Onpattro) [121]. Препарат направлен против мРНК транстиретаина, представляет собой двуцепочечный 21-звенный фрагмент РНК, инкапсулированный в липидные частицы. Часть нуклеотидов несет 2'-О-метильную модификацию. Свисающие двухнуклеотидные концы представлены дезоксирибонуклеотидами.

В заключение можно отметить, что по количеству одобренных и находящихся в клинических испытаниях препаратов индукторов РНК-интерференции это направление развито пока в несколько меньшей степени по сравнению с АСО.

Таблица 2. Препараты на основе siРНК, находящиеся в клинических испытаниях.

Заболевание	Препарат	Мишень	Фаза	Ссылка
Сухой кератит	SYL1001	TRPV1	II	NCT01776658
Открытоугольная глаукома	SYL040012/bamosiran	ADRB2	II	NCT02250612
Закрытоугольная глаукома	QPI-1007	CASP2	III	NCT01064505 NCT01965106 NCT02341560
Глаукома	PF-655	RTP801/REDD1	II	NCT00713518 NCT01445899
Гиперхолестеринемия	ALN-PCSSC	PCSK9	I	NCT02314442
Гемофилия	ALN-AT3	AT	I	NCT02035605
Печеночная порфирия	ALN-AS1	ALAS1	I	NCT02452372
Пароксизмальная ночная гемоглобинурия	ALN-CC5	C5	II	NCT02352493
Гипероксалурия	DCR-PH1	HAO1	Доклинические	NA
Familial amyloidotic polyneuropathy	ALN-TTR02/patisiran	TTR	III	NCT02053454 NCT01961921 NCT01960348
Наследственная амилоидная полиневропатия	ALN-TTRsc/revusiran	TTR	III	NCT01814839 NCT02292186 NCT02319005
Дефицит альфа-1-антитрипсина	ALN-AAT	AAT	II	NCT02503683
Дефицит альфа-1-антитрипсина	ARC-AAT	AAT	I	NCT02363946
Фиброз печени	ND-L02-S0201	HSP47	II	NCT02227459
Аденоматозный полипоз	CEQ508	β -Catenin	I	NA
Врожденная пахионихия	TD101	K6a (N171K mutation)	I	NCT00716014

Келоидный рубец	RXI-109	CTGF	II	NCT02079168 NCT02246465 NCT02030275
Алкоголизм	TKM-ALDH	ALDH	Доклинические	NA
Метастазирующие опухоли	APN401	Cbl-b/DC cancer vaccine	I	NCT02166255
Различные виды опухолей	FANG	Furin/DC cancer vaccine	III	NCT01061840 NCT01505166 NCT01453361 NCT01551745
Гепатоцеллюлярная карцинома	MRX34	miR-34 mimic	I	NCT01829971
Гепатоцеллюлярная карцинома	TKM-PLK1/TKM-080301	PLK1	II	NCT01262235 NCT02191878
Метастазирующие опухоли	Pbi-shRNA STMN	STMN	I	NCT01505153
Рак поджелудочной железы	SiG12D LODER	KRAS-G12D	III	NCT01188785 NCT01676259
Метастазирующие опухоли	siRNA-EphA2 DOPC	EPHA2	I	NCT01591356
Гепатоцеллюлярная карцинома; миелома, лимфома	DCR-MYC	MYC	II	NCT02110563 NCT02314052
Вирус гепатита С	TT-034	HCV	II	NCT01899092 NCT02315638
Вирус гепатита В	TKM-HBV	HBV	I	NA
Вирус гепатита В	ARC-520	HBV	II	NCT02065336 NCT02349126
Вирус Эбола	TKM-Ebola-Guinea	VP24; VP35; Ebola L-polymerase	II	NCT02041715

1.4 Рибозимы

Рибозимы – это природные или искусственные молекулы РНК, проявляющие каталитическую активность. Для нашей работы интерес представляют рибозимы, которые способны к сайт-направленному расщеплению РНК. Среди природных рибозимов только один

– рРНК – катализирует образование пептидной связи [122], все остальные, объединяемые не менее чем в 12 классов, катализируют реакцию расщепления/лигирования РНК (Таблица 3). Идея использовать рибозимы в медицине возникла вскоре после их открытия [123]. На сегодняшний день для четырех классов рибозимов предпринимались попытки создать на их основе терапевтический препарат. К таковым относятся РНКаза Р [124–128], «шпилечный» рибозим (hairpin ribozyme) [129–131], HDV (hepatitis delta virus ribozyme, рибозим вируса гепатита дельта) [132–134], а также рибозим «головка молотка» (hammerhead), исследованию которого посвящено наибольшее число работ [135–137].

Таблица 3. Природные рибозимы, катализирующие реакции расщепление/лигирование РНК.

Рибозим	Год открытия	Ссылка
«Большие» рибозимы		
Интроны I группы	1982	[138]
РНКаза Р	1983	[139]
Интроны II группы	1986	[140]
«Малые» рибозимы		
«Головка молотка»	1986	[141]
«Шпилечный»	1986	[142]
Вирус гепатита дельта	1988	[143]
Varkud-satellite (VS)	1990	[144]
GlmS	2004	[145]
Twister	2014	[146]
Hatchet	2015	[147]
Pistol	2015	[147]
Twister sister	2015	[147]

РНКаза Р удаляет 5'-лидерную последовательность из пре-тРНК, превращая ее в зрелую тРНК. РНКаза Р состоит из РНК-субъединицы и одной или нескольких белковых субъединиц. Каталитической активностью обладает ее РНК-субъединица, причем РНК-субъединица РНКазы Р из *E. coli* (M1 РНК) способна проявлять активность и в отсутствие белковой субъединицы. РНКаза Р «узнает» главным образом не последовательность, а третичную структуру РНК, хотя ССА-конец узнает за счет комплементарных взаимодействий. В присутствии направляющего олигонуклеотида, формирующего с РНК-мишенью комплементарный комплекс, имитирующий структуру тРНК, РНКаза Р расщепляет РНК-мишень по определенному сайту (Рис. 3) [124,148,149], причем направляющий олигонуклеотид может быть ковалентно связан с ее

каталитической РНК субъединицей. Таким способом на основе РНКазы Р из *E. coli* был создан рибозим, направленный против мРНК гена IE2 цитомегаловируса человека (HCMV) [150]. С помощью процедуры *in vitro* селекции [151] были отобраны наиболее эффективные варианты рибозима [126,150], подавляющие экспрессию IE1/IE2 на 98-99%, продукцию вируса в 50000 раз [127] и повышающие выживаемость инфицированных HCMV (цитомегаловирус мышей) мышей с 27-27 дней до 50-80 дней [128]. Таким образом, на сегодняшний день существует единственный потенциальный терапевтический препарат на основе РНКазы Р, и он еще не дошел до стадии клинических испытаний.

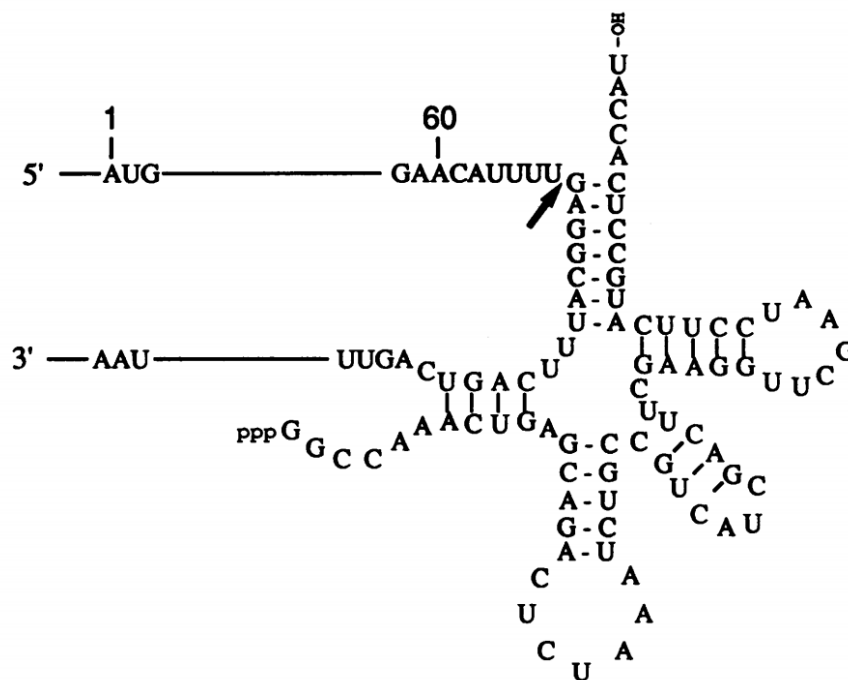


Рис. 3. Формируемый САТ мРНК и направляющим олигонуклеотидом комплекс, являющийся субстратом РНКазы Р. Стрелкой показан сайт расщепления [124].

Рибозим HDV привлекает внимание благодаря высокой устойчивости в человеческих клетках ($\tau_{1/2} = 100$ ч) и высокой эффективности при внутриклеточных (~ 1 мМ) концентрациях Mg^{2+} [134], тогда как эффективность hammerhead-рибозима падает при концентрации Mg^{2+} ниже 10 мМ. Природный вариант рибозима HDV не совсем подходит для селективного сайт-направленного расщепления РНК, поскольку «узнает» 7 нуклеотидов мишени при требуемых для достижения специфичности 16 нуклеотидов. Именно поэтому был создан модифицированный вариант HDV рибозима в котором сайт узнавания был увеличен до 17 нуклеотидов [132]. Предпринимались попытки использовать HDV рибозим против вирусов гриппа [152] и HIV-1 [153], мРНК гена предшественника бета-амилоида [154], ассоциированного с развитием болезни Альцгеймера, а также против РНК-субъединицы

теломеразы [155]. Несмотря на имеющиеся положительные результаты, развитие этой области пока ограничивается исследованиями *in vitro*.

Рибозимы «головка молотка» и «шпилечный» - одни из первых открытых, наилучшим образом изученных, чаще всего применяемых для создания медицинских препаратов. Семь препаратов-рибозимов проходили клинические испытания, шесть из них были созданы на основе рибозима «головка молотка», один на основе «шпилечного» рибозима (Таблица 4) [82,156].

Таблица 4. Препараты на основе рибозимов, находящиеся в клинических исследованиях [156].

Компания	Лекарство	Заболевание	Фаза	Тип	Ссылка
Merck-Sirna	Angiozyme	Renal Carcinoma	II	«головка молотка»	[157,158]
Merck-Sirna	Heptazyme	HCV	II	«головка молотка»	[156]
UCSD	MY-2	HIV	I	«шпилечный»	[159]
Johnson & Johnson, St. Vincent's Hospital	RRz2	HIV	I	«головка молотка»	[160]
Janssen-Cilag Pty Ltd, UCLA	OZ1 (RRz2)	HIV	II	«головка молотка»	[161]
City of Hope, Benitec	CCR5 ribozyme	HIV	0	«головка молотка»	[162]
Ribozyme, City of Hope	L-TR/Tatneo	HIV	II	«головка молотка»	NCT00002221

Природные варианты этих рибозимов действуют внутримолекулярно (*in cis*). На рисунке 4 [163] на примере рибозима «головки молотка» показано, каким образом можно сконструировать *in trans* действующий вариант рибозима [164], предназначенный для селективного расщепления выбранной РНК. Каталитически активная структура образуется в результате взаимодействия рибозима (R) и РНК-мишени (субстрата, S). Расщепление в природном рибозиме происходит после триплета GUC17 (Рис. 4), в искусственных рибозимов «головки молотка» после триплета NNN, где N – любой нуклеотид, H – любой нуклеотид, кроме G [165]. Таким образом, рибозим «головка молотка» теоретически может быть нацелен практически против любой РНК. В случае протяженных РНК, однако, расщепление наблюдается не всегда, даже по GUC-сайтам, вероятно, из-за того, что длинная РНК формирует третичную структуру, в которой доступ к некоторым участкам затруднен [166].

рибозим, направленный против HIV [159]. Вектор, включающий два «шпилечных» рибозима, трансдуцировали в CD4⁺ Т-клетки. Во всех случаях побочных эффектов не наблюдалось, экспрессия рибозима была детектирована, однако терапевтического эффекта не наблюдалось, возможно, вследствие низкого числа экспрессирующих его клеток [173].

Первый синтетический рибозим, проверенный в клинических испытаниях – Angiozyme – рибозим «головка молотка», направленный против мРНК рецептора Flt-1 фактора роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor) [157,158], прошел I и II фазы клинических испытаний. Он также оказался безопасным, однако из-за слабого эффекта дальнейшие испытания не проводились [174]. Разработанный той же компанией (Merck-Sirna) Hepzyme, направленный против вируса гепатита С, оказался небезопасным. Во время испытаний на обезьянах, проходивших одновременно с клиническими испытаниями, одно из подопытных животных потеряло зрение. Клинические испытания были прерваны на второй фазе [18,156].

Среди остальных исследований особого упоминания заслуживает комбинированный подход, заключающийся в воздействии на вирус HIV несколькими различными способами одновременно. Клетки CD34⁺ были трансдуцированы конструкцией, экспрессирующей shРНК, направленную против мРНК генов Tat и Rev, РНК-шпильку, связывающую TAR и рибозим «головка молотка», расщепляющий мРНК гена CCR5 [162].

К сожалению, все клинические испытания рибозимов продемонстрировали очень слабые терапевтические эффекты или полное их отсутствие [156,173,175]. Таким образом, рибозимы как ген-направленные препараты сегодня «проигрывают» как АСО, так и siРНК, несмотря на то, что последнее направление возникло на 12 лет позже. Однако делать вывод, что рибозимы исчерпали себя, на наш взгляд, преждевременно. Так, отсутствие эффекта HIV-направленных препаратов связано не со свойствами рибозимов как таковых, а с невозможностью трансдуцировать большую часть клеток. Далее, рибозимы могут быть полезны, например, в бактериях, не имеющих системы РНК-интерференции [176]. Кроме того, применение сайт-направленного расщепления РНК не ограничивается только регуляцией экспрессии генов или селективным расщеплением вирусной РНК, хотя эти направления сейчас разрабатываются в наибольшей степени. Рибозимы могут найти применения в синтетической биологии [29], а также в качестве биосенсоров [32].

1.5 ДНКзимы

ДНКзимы представляют собой молекулы ДНК, способные катализировать различные типы реакций, в том числе гидролитическое расщепление РНК. В отличие от рибозимов,

ДНКзимы не встречаются в природе. Первый ДНКзим был создан в 1994 [177], с использованием метода *in vitro* селекции, или направленной эволюции, позволяющего из пула случайных последовательностей отобрать каталитически активные молекулы и являющегося главным методом получения новых ДНКзимов и рибозимов. Первый ДНКзим обладал многими недостатками, не позволяющими использовать его в качестве терапевтического агента, в частности, он проявлял активность только в присутствии ионов Pb^{2+} . Поворотным пунктом в развитии ДНКзимов было создание в 1997 ДНКзимов 10-23 и 8-17 (Рис. 5), требующих присутствия ионов магния, что делает их подходящими для использования *in vivo* [178].

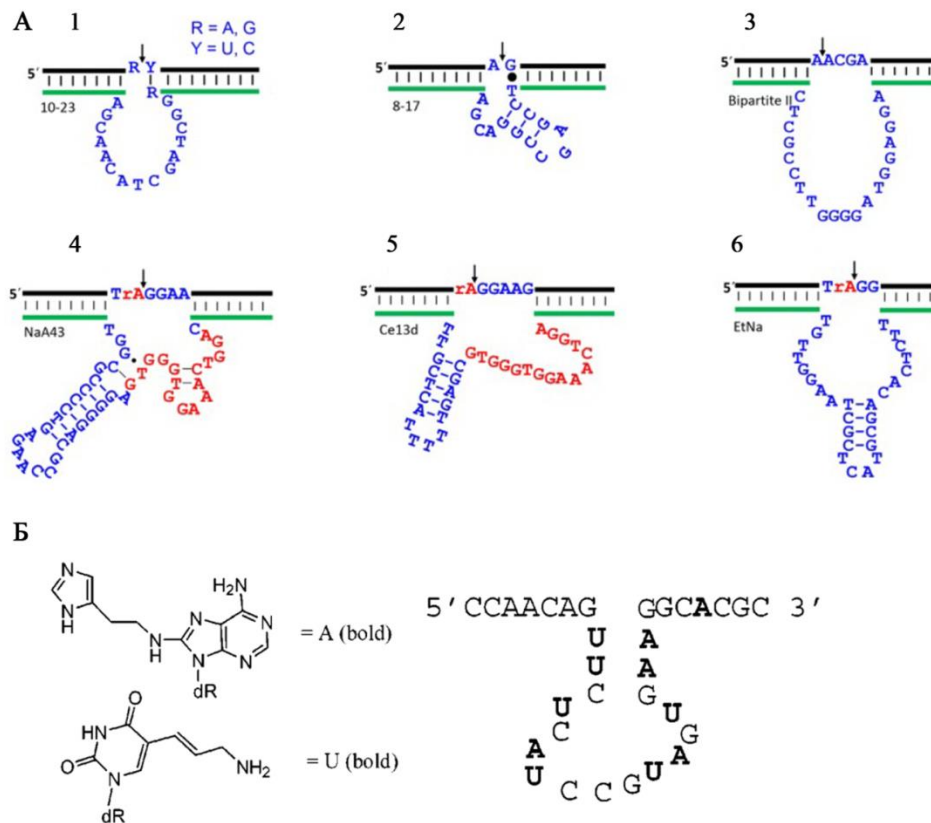


Рис. 5. А. Вторичные структуры некоторых РНК-расщепляющих ДНКзимов. 1. 10-23. 2. 8-17. 3. Bipartite II. 4. NaA43. 5. Ce13d. 6. EtNa. ДНКзимы 1, 2 и 3 способны расщеплять РНК-субстраты и пригодны в качестве терапевтических агентов. Рибозимы 4, 5 и 6 способны расщеплять только по одиночному рибонуклеотиду («rA») в окружении дезоксирибонуклеотидов. Стрелки показывают сайты расщепления. Красным показаны идентичные участки NaA43 и Ce13d [179]. Б. ДНКзим с модифицированными основаниями [28].

РНК-расщепляющий ДНКзим представляет собой олигодезоксирибонуклеотид, включающий два РНК-связывающих домена, фланкирующих центральный каталитический

домен (Рис. 5). Длина связывающих доменов определяется теми же факторами, что и для других РНК-расщепляющих агентов: ДНКзим должен менее прочно связываться с продуктами реакции, чем с субстратом. Подобно рибозимам, для ДНКзимов существуют незначительные ограничения по расщепляемой последовательности. Так, 10-23 расщепляет по R↓Y-сайту, где R=A,C, Y=U,C. Очевидно, что для практических задач подобные ограничения несущественны, т.е. ДНКзимы могут применяться против любой мРНК. На данный момент, различные варианты ДНКзима 10-23, например, опробованы против как минимум 50 различных мишеней [179].

ДНКзимы как РНК-расщепляющие агенты при сопоставимой или даже превосходящей эффективности расщепления РНК обладают перед рибозимами рядом преимуществ [180]: они дешевле, стабильнее, требуют введения меньшего числа модификаций.

ДНКзим 10-23 может выступать как специфический расщепляющий агент и/или как обычный АСО. В последнем случае происходит либо расщепление РНК РНКазой H, либо стерическое блокирование мРНК. Вклад этих механизмов в подавление экспрессии можно оценить, используя в качестве контроля неактивный вариант ДНКзима с однонуклеотидной заменой [180].

В ряде исследований было показано снижение уровня экспрессии целевого гена на 40% и замедление клеточного роста на 50% под действием ДНКзимов [179]. Различные варианты ДНКзима 10-23 дошли до I/II фазы клинических испытаний (Таблица 5) [180]. Тем не менее, применение ДНКзимов может вызывать побочные эффекты, в той или иной степени характерные и для других РНК-направленных агентов. Причинами побочных эффектов являются: частичная комплементарность с нецелевыми последовательностями, неспецифическое связывание с белками в результате формирования определенной третичной структуры, взаимодействие с толл-подобными рецепторами, вызывающее иммунный ответ [180].

Интересным направлением являются ДНКзимы модифицированные различными группами, обеспечивающими расщепление фосфодиэфирных связей в РНК (Рис. 5Б). По сути, они представляют собой искусственные рибонуклеазы, созданные на основе ДНКзимов. В качестве расщепляющих агентов выступают имидазольные группы в сочетании с первичными аминами, имитирующие гистидин и лизин активного центра природных РНКаз. Такие иРНКазы/ДНКзимы могут быть получены либо *in vitro* селекцией с использованием модифицированных нуклеозидтрифосфатов [28,181], либо модификацией уже известных ДНКзимов, таких как 10-23 [182] и 8-17 [183].

Таблица 5. Препараты на основе ДНКзимов, находящиеся в клинических испытаниях.

ДНКзим	Заболевание	Мишень	Фаза	Ссылка
Dz13 (10-23)	Базалиома	c-Jun	I	[184]
DZ1 (10-23)	Назофарингеальная карцинома	Epstein-Barr virus LMP1 mRNA	I/II	[185]
SB010 (hgd40, 10-23)	Бронхиальная астма	GATA-3 мРНК	I	[186]
SB011(hgd40, 10-23)	Атопический дерматит	GATA-3 мРНК	II	NCT02079688
SB012 (hgd40, 10-23)	Ulcerative colitis	GATA-3 мРНК	I	[180]

Пять ДНКзимов находятся на I-II стадиях клинических испытаний. Так, например, препарат SB010 на основе ДНКзима 10-23 направлен против мРНК гена GATA-3, являющейся терапевтической мишенью при бронхиальной астме. В клинических испытаниях было показано улучшение функционирования легких у всех пациентов при отсутствии побочных эффектов [180,186].

1.6 CRISPR Cas

Говоря о сайт-направленном расщеплении РНК, совершенно невозможно обойти вниманием CRISPR-Cas - систему адаптивного иммунитета прокариот, направленную против вирусов и других мобильных генетических элементов. Система включает локусы CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) и гены cas (CRISPR associated sequence). Транскрибируемая с CRISPR РНК (CRISPR RNAs, crRNAs) формирует с одним или несколькими Cas-белками эффекторный комплекс (crRNA-Cas, crRNP), который связывает чужеродную ДНК/РНК за счет комплементарных взаимодействий с crРНК, а затем уничтожает ее за счет нуклеазной активности Cas-белков [187].

Локусы CRISPR состоят из чередующихся повторов длиной 24-40 нуклеотидов и уникальных последовательностей-спейсеров 20-60 нуклеотидов длиной. Впервые локус CRISPR был обнаружен у *E. coli* в 1987 [188], в 1993 схожий по структуре, но отличающийся по последовательности локус был найден в геноме археи *Haloferox mediterranei* [189]. Система CRISPR-Cas весьма распространена среди прокариот – около 45% геномов бактерий и 90% архей содержат один или несколько модулей CRISPR-Cas [190]. Было установлено, что последовательность спейсеров соответствуют участкам плазмид и геномов бактериофагов

[191]. Предположение о связи CRISPR-локусов с адаптивным иммунитетом экспериментально было подтверждено в 2007 с одновременным доказательством роли белков Cas [192].

Было показано, что расщепляющей активностью обладает комплекс, состоящий из направляющей crPHK и шести Cas-белков (Cmr1-6). Похожий механизм был показан для системы типа III-A (Csm) [193]. В обоих типах комплексов определенный Cas-белок (Csm3 в типе III-A и Cmr4 в типе III-B) представлен в четырех или более копиях. Белки Csm3 и Cmr4 представляют собой эндорибонуклеазы суперсемейства Cas7, вносящие в целевую РНК разрывы с интервалом 6 нуклеотидов так, что целевая РНК оказывается расщепленной по четырем или более сайтам [194].

Среди белков CRISPR-Cas системы типа III РНКазной активностью обладают также белки Csm6 (III-A) и Csx1 (III-B). Общим для этих белков является С-концевой нуклеотид-связывающий домен HERN, содержащий РНКазный активный сайт. РНКазы Csm6 и Csx1 не входят прочно в эффекторный комплекс [195], и не ясно, действуют ли они *in trans* или кратковременно связываются с комплексом [187]. РНКазная активность Csm6 и Csx1 активируется аллостерически олигоденилатами, синтезируемыми из АТФ белком palm эффекторного комплекса [187]

На основе особенностей Cas-белков и свойств эффекторных комплексов все многообразие систем CRISPR-Cas делится на шесть основных типов, объединенных в два класса [190]. Системы класса 1 (типы I, III и IV) характеризуются наличием нескольких Cas-белков, включая одну или несколько эндонуклеаз. Системы класса 2 (типы II, V и VI) образуют комплекс, содержащий только один белок, состоящий из нескольких доменов [187]. Каждый тип подразделяется еще на несколько подтипов. Для нашей работы интерес представляют системы II и III типа, способные наряду с ДНК расщеплять РНК, и VI типа, действующие только на РНК [187].

Особенностью системы CRISPR-Cas типа III является способность расщеплять как двуцепочечную ДНК, так и одноцепочечную РНК, причем ДНК расщепляется только в процессе транскрипции [196]. Программируемое расщепление РНК CRISPR-Cas системой впервые было показано для системы типа III-B, найденной в геноме термофильной археи, *Pyrococcus furiosus* [195]. К настоящему моменту возможность подавления РНК системой CRISPR-Cas типа III многократно подтверждена [195,197–199], однако система типа III не является самой перспективной для практического применения, поскольку требует одновременного участия 6-7 Cas белков. Большой интерес представляют системы класса 2: типы II и VI.

Система CRISPR-Cas9 (класс 2, тип II) – наиболее часто используемая система CRISPR-Cas для РНК-направленного воздействия [187,196]. Рибонуклеаза Cas9 расщепляет двуцепочечную ДНК, однако также могут расщеплять одноцепочечную РНК [200]. Эта способность Cas9 используется для внутриклеточной визуализации транскрипта (при «выключенной» функции расщепления) [201], подавления экспрессии гена в клетках человека [202,203], уничтожения РНК-содержащих вирусов в эукариотических клетках [204].

Система CRISPR-Cas13 (тип VI) специфически расщепляет РНК, но не ДНК [205]. Несмотря на то, что система была открыта недавно [206], области ее применения разнообразны: подавление экспрессии гена как в бактериальных [207], так и в эукариотических клетках [208], редактирование РНК [209], детекция нуклеиновых кислот [210], регуляция сплайсинга [211]. По ряду причин именно система Cas13 среди других CRISPR-Cas систем подходит для манипуляций с РНК. Во-первых, относительная простота – система включает только одну рибонуклеазу Cas13. Во-вторых, тип VI специфичен именно против РНК. Кроме того, существует множество подтипов CRISPR-Cas13, подходящих для разных приложений.

1.7 Искусственные рибонуклеазы

Характерной особенностью искусственных рибонуклеаз (здесь и далее иРНКаз) сайт-направленного действия является наличие в их структуре двух доменов: каталитического и РНК-узнающего [212]. Функцией каталитического домена является расщепление фосфодиэфирной связи. В роли домена, катализирующего реакцию трансэтерификации, выступают функциональные группы, координирующие ионы металлов, различные органические молекулы, короткие пептиды. В задачу данного обзора входит подробно проследить пути развития всевозможных каталитических доменов иРНКаз. Функция каталитического домена заключается в расщеплении любой фосфодиэфирной связи, а специфичность расщепления обеспечивается узнающим доменом, в роли которого выступает олигонуклеотид. Это может быть олигодезоксирибонуклеотид, однако нередко используют различные модифицированные олигонуклеотиды, подробно рассмотренные нами ранее. Модификации олигонуклеотидов, как и в случае АСО, служат двум главным целям: повышению устойчивости иРНКаз к нуклеазам и облегчению проникновения их в клетки.

Роль олигонуклеотида в составе иРНКазы не ограничивается сближением каталитического домена и предназначенной для расщепления фосфодиэфирной связи. Образование дуплекса между РНК-мишенью и иРНКазой нарушает вторичную и третичную структуру РНК в месте связывания и облегчает расщепление по расположенным вблизи фосфодиэфирным связям. Например, связывание иРНКазы может индуцировать

разворачивание двуцепочечных участков, фосфодиэфирные связи в которых стабильнее, чем в одноцепочечных участках [213]. Некоторые иРНКазы индуцируют формирование в структуре РНК петлю, по которой может происходить расщепление [212].

Одним из важнейших свойств иРНКаз, как и для других РНК-расщепляющих агентов, является способность к действию в каталитическом режиме, т.е. способность одной молекулы иРНКазы расщепить несколько молекул РНК-мишени. Эта способность обеспечивает высокую эффективность иРНКазы и возможность использования ее в относительно низких (субмикромольных) концентрациях. Необходимость каталитического расщепления предъявляет противоречивые требования к иРНКазам, в первую очередь, к узнающему домену: иРНКазы должна достаточно прочно связываться с мишенью, чтобы произошло расщепление, и слабо связываться с продуктами реакции, представляющими собой два фрагмента РНК-мишени. Требуется подобрать длину олигонуклеотида в соответствии с этими требованиями, при этом минимальная длина узнающего домена обусловлена необходимостью специфичного узнавания мишени. Поскольку геном человека составляет около 3×10^9 пар оснований, или около 4^{16} , минимальная длина олигонуклеотида, обеспечивающего специфическое узнавание мишени составляет 16 нуклеотидов [179]. Природа каталитического домена, структура линкера, точка присоединения последнего к олигонуклеотиду – все эти факторы также влияют как на степень связывания, так и на эффективность расщепления РНК иРНКазой.

Как и в случае с большинством рассмотренных нами ранее РНК-расщепляющих агентов, расщепление РНК иРНКазой осуществляется в результате реакции трансэтерификации, проходящей по механизму нуклеофильного замещения S_N2 . Реакция проходит следующим образом: 2'-О (нуклеофил) атакует атом фосфора, в результате образуется пятикоординационный переходный комплекс, в центре которого находится атом фосфора [214]. 5'-О покидает комплекс, в результате образуются фрагменты РНК, несущие 5'-ОН и 2',3'-циклофосфат. В отдельной главе мы в деталях разберем этот механизм, здесь же необходимо отметить, как именно данный механизм определяет дизайн иРНКаз. Существует несколько механизмов, повышающих скорость реакции: депротонирование атакующего 2'-кислорода, протонирование уходящей группы (5'-кислород). Может быть использован только один из них, либо оба одновременно, причем в последнем случае возможен, например, перенос протона с 2'-кислорода на 5'-кислород. Отсюда следует, что каталитическая группа иРНКазы должна быть акцептором и/или донором протонов в физиологических условиях. Таким требованиям отвечает, например, имидазольная группа. Так, в РНКазе А именно остатки гистидина являются акцепторами и донорами протона, обеспечивая эффективное расщепление фосфодиэфирной связи.

Другой механизм ускорения реакции – обеспечение линейной конформации расщепляемой связи, при которой атомы Р, 5'О и 2'О находятся на одной линии [214]. Такая конформация не может реализоваться, в частности, в двуцепочечных участках, в протяженных полипуриновых последовательностях, стабилизированных сильными стэкинг-взаимодействиями [212,214]. Данные требования накладывают ограничения на выбор последовательности-мишени.

Прежде чем переходить к описанию конкретных иРНКаз, необходимо отметить, что их прямое точное сравнение затруднено, а в некоторых случаях невозможно. Во-первых, в большинстве исследований измерение эффективности иРНКаз проводится на основе электрофореза, являющегося полуколичественным методом. Во-вторых, исследования проводятся в разных условиях (рН, температура, время инкубации, концентрации иРНКаз и мишени и т. д). Для адекватного сравнения иРНКаз, в обзоре [212] авторы данные, полученные другими авторами экстраполировали к наиболее часто используемым условиям: рН 7.5, 37 °С, ионная сила раствора $I = 0.1$ М и сравнили различные иРНКазы по периоду полурасщепления РНК мишени ($\tau_{1/2}$) в этих условиях [212]. Таким образом, здесь и далее под эффективностью иРНКаз подразумевается период полурасщепления РНК мишени в указанных условиях.

Искусственные рибонуклеазы делятся на две основные группы: металл-содержащие и металл-независимые. В первом случае катализатором расщепления является ион металла, координированный какой-либо группой, ковалентно присоединенной к олигонуклеотиду. Металл-зависимые иРНКазы, в свою очередь, делятся на две группы. К первой относятся иРНКазы на основе ионов лантаноидов, чаще всего трехвалентных. Ко второй группе относятся иРНКазы на основе двухвалентных ионов меди и цинка. В металл-независимых иРНКазах используются различные органические соединения, часто имитирующие каталитический центр природных рибонуклеаз. Так, остатки имидазола в иРНКазах имитируют действие остатков гистидина His119 и His12 РНКазы А. Среди других групп, способных ускорять реакцию расщепления фосфодиэфирной связи, аминогруппы и гуанидиновые группы, например, аргинина. Механизм действия гуанидиновых групп мы рассмотрим отдельно, поскольку в исследуемых нами иРНКазах каталитический домен содержит остатки аргинина.

1.7.1 Искусственные рибонуклеазы, основанные на ионах лантаноидов

Расщепление фосфодиэфирных связей РНК ионами металлов при физиологических значениях рН было показано в 1960х гг [215], причем особенно эффективными оказались ионы лантаноидов [216], являющимися сильными кислотами Льюиса. В 1994 была сделана попытка создать иРНКазу на основе комплексов лантаноидов, способную к сайт-направленному расщеплению РНК [217]. Первая иРНКаза представляла собой конъюгат 15-звенного

олигодезоксирибонуклеотида с присоединенным к 5'-концу остатком иминодиуксусной кислоты, координирующим ион лантаноида (Рис. 6А). Важнейший результат – 17% РНК-мишени было расщеплено за 8 ч при рН 8.0 и 37 °С. Согласно оценочной экстраполяции $\tau_{1/2}$ составляет около 100 ч при рН 7.5 [212]. Такой результат был получен для ионов лютеция (Lu^{3+}), европия (Eu^{3+}) и тулия (Tm^{3+}), а в случае лантана (La^{3+}) эффективность была в два раза ниже [217]. Данный конъюгат служит первым примером создания металл-зависимой иРНКазы сайт-направленного действия. Возможным объяснением низкой каталитической эффективности этих иРНКаз может быть использование отрицательно заряженных лигандов для

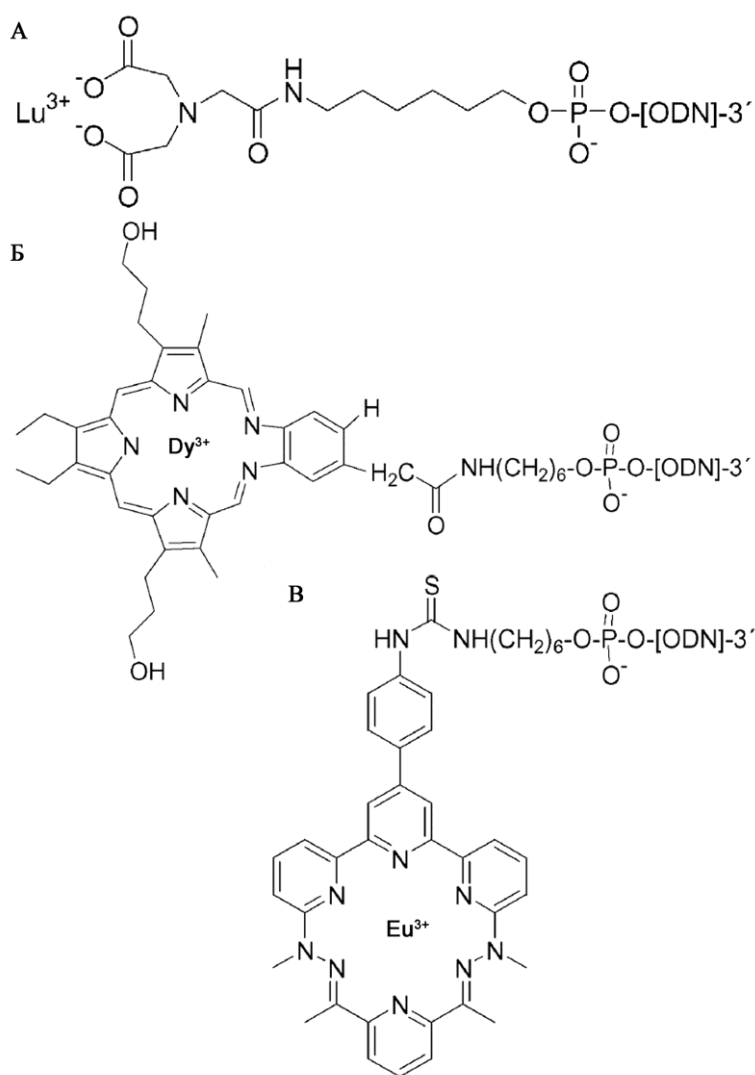


Рис. 6. Металл-зависимые иРНКазы, включающие олигонуклеотид и лиганд, координирующий ион лантаноида. **А.** Конъюгат 15-звенного олигодезоксирибонуклеотида (ODN) и иминодиуксусной кислоты, координирующей ион Lu^{3+} [212,217]. **Б.** Конъюгат олигодезоксирибонуклеотида (ODN) и тексафирина, координирующей ион Dy^{3+} [212]. **В.** Конъюгат олигодезоксирибонуклеотида (ODN) и пиридинового циклофан, координирующей ион Eu^{3+} [212].

координирования иона металла: они очень хорошо связывают катионы, но, вместе с этим, видимо, снижают их каталитическую активность. Успешной оказалась попытка увеличить активность конъюгатов путем использования в качестве лигандов нейтральных макроциклов: тексафирина (Рис. 6Б) и пиридинового циклофана (Рис. 6В). Конъюгаты на основе этих макроциклов и лантаноидов диспрозия (Dy^{3+}), европия (Eu^{3+}) показали $t_{1/2}$ 50, 10 и, в лучшем случае, 2.1 ч [218]. На данном этапе также удалось продемонстрировать каталитический режим для некоторых иРНКаз [219] в результате присоединения каталитической группы не к концу олигонуклеотида, а к одному из внутренних нуклеотидов. Идея заключалась в том, что степень связывания такой иРНКазы с мишенью после расщепления уменьшается, и, как следствие, повышается вероятность высвобождения конъюгата из комплекса и взаимодействие с новой мишенью. Учитывая, что гораздо проще расщепить РНК по одноцепочечному участку, напрашивается идея подобрать последовательность узнающего домена так, чтобы при связывании с иРНКазой РНК-мишень формировала петлю, по которой и будет проходить расщепление. И хотя возможность расщепления РНК без формирования петли также была показана [219], иРНКазы чаще конструируют таким образом, чтобы индуцировать формирование петли в РНК-мишени, причем в некоторых случаях формирование даже однонуклеотидной петли заметно ускоряет расщепление [220,221].

Существует альтернативная система расщепления РНК, включающая конъюгат олигонуклеотида с акридином и свободные ионы лантаноидов [222]. Такая схема может быть чрезвычайно полезна для расщепления РНК *in vitro*, однако не пригодна в качестве терапевтического средства или для регуляции экспрессии генов.

1.7.2 иРНКазы, основанные на ионах Cu^{2+}

иРНКазы, содержащие в каталитическом домене ионы меди Cu^{2+} , в целом менее эффективны, чем иРНКазы, содержащие лантаноиды [212]. Они, однако, интересны тем, что ионы Cu^{2+} встречаются внутри клетки, таким образом, можно ожидать, что связывающие Cu^{2+} лиганды, попав в клетку, смогут образовать расщепляющий комплекс.

Медь-содержащие иРНКазы были созданы позже лантаноид-содержащих агентов. Первый такой конъюгат был получен в 1994 [223]. Он представлял собой 17-звенный олигонуклеотид и присоединенный по внутреннему нуклеотиду терпиридиновый остаток, координирующий ион меди. Этот конъюгат характеризуется временем полурасщепления $t_{1/2}$ 400 ч (для спонтанного расщепления $t_{1/2}$ около 14 лет), в более поздних вариантах, изменяя структуру линкера, период полурасщепления удалось снизить до $t_{1/2}$ 40 ч [224,225]; для этой иРНКазы также была показана возможность многооборотного гидролиза [224].

Пример кооперативного взаимодействия двух конъюгатов с медь-координирующим лигандом, присоединенном либо к 5', либо к 3'-концу олигонуклеотида был приведен в работе [226]. Каждый из конъюгатов обладал низкой активностью, однако при их совместном использовании наблюдалось кооперативное взаимодействие с РНК-мишенью, ее быстрое расщепление ($\tau_{1/2}$ 5 ч) и возможность многооборотного гидролиза [226].

Другой лиганд, образующий хелатный комплекс с ионами меди и пригодный для конструирования иРНКаз - это 2,9-диметил-5-аминофенантролин, причем такой конъюгат оказался 5 раз активнее конъюгата на основе терпиридина по периоду полурасщепления [225].

1.7.3 иРНКазы, основанные на ионах Zn^{2+}

Другим часто используемым для создания иРНКаз ионом является Zn^{2+} . Внутриклеточная концентрация Zn^{2+} составляет около 1 μ М, что гарантирует образование комплексов с цинк-связывающим соединением с константой порядка наномолярной. Для создания цинк-содержащих иРНКаз могут быть использованы те же лиганды, что и для медь-содержащих, например, 5-амино-2,9-диметилфенантролин. Однако цинк-содержащие иРНКазы часто менее активны, чем медь-содержащие. Так, хелатный комплекс 5-амино-2,9-диметилфенантролина с ионом Zn^{2+} в 2.5 раза менее активен по периоду полурасщепления РНК-мишени, чем с Cu^{2+} [227].

Было показано, что присоединение каталитического домена к азотистому основанию выгоднее, чем к 2'-О положению рибозы. Наиболее удобной для расщепления оказалась петля длиной 3-4 нуклеотида, причем было показано, что расщеплению подвергаются все фосфодиэфирные связи в петле, однако связи, прилегающие к двуцепочечному участку, расщепляются с меньшей скоростью. Время полурасщепления РНК для лучших цинк-содержащих иРНКаз составляет 9-30 ч, а некоторые из них продемонстрировали способность к многооборотному гидролизу [228,229]. Как и для других типов, для цинк-содержащих иРНКаз в качестве узнающего домена иногда используют различные модифицированные олигонуклеотиды, например, пептидо-нуклеиновые кислоты [230].

Предпринимались попытки объединить в каталитическом домене одной иРНКазы и остатки имидазола и ионы цинка. Период полурасщепления РНК-мишени для нее составил $\tau_{1/2}$ 300 ч [231].

Отметим серию работ, в которых в качестве Zn-связывающего лиганда использовали 1,4,7-триазациклододекан [232]. Было показано, что оптимизируя структуры линкера, соединяющего олигонуклеотид и каталитический домен, может на порядок увеличить скорость

расщепления РНК иРНКазой. Также отметим работу, в которой представлена иРНКаза, каталитический домен которой координировал два иона цинка [233].

Подводя итог, выделим главное преимущество металл-содержащих иРНКаз – высокая скорость расщепления по сравнению с металл-независимыми иРНКазами, сочетающаяся во многих случаях с возможностью многообратного гидролиза, а также их серьезный и принципиально неустранимый недостаток – потеря иона, происходящая в присутствии любых белков, приводящая к повреждению нецелевых молекул и, как следствие, токсическим эффектам [234].

1.7.4 Металл-независимые иРНКазы

В качестве каталитического домена в металл-независимых иРНКазах могут быть использованы различные органические конструкции, содержащие такие группы, как имидазольные [235], другие гетероциклические основания [236], диамидные [237], акридиновые [238] и гуанидиновые [239]. Все эти группы в физиологических или близких к ним условиях способны выступать акцептором/донором протона у 2'-ОН-группы, обеспечивая, таким образом, катализ реакции трансэтерификации. Отдельную группу металл-независимых иРНКаз представляют пептид-содержащие иРНКазы.

Впервые металл-независимая иРНКаза была представлена в работе [240]. Сайт-направленное расщепление РНК было достигнуто с помощью конъюгата олигодезоксирибонуклеотида и диэтилентриамин. Данный конъюгат не проявлял высокой активности: при pH 8 и 50 °C $\tau_{1/2}$ составляет 40 ч, оценка при pH 7.5 и 37°C дает для $\tau_{1/2} \geq 200$ ч. Аналогичный конъюгат, формирующий в РНК петлю, оказался в два раза менее активным, чем линейный, и не работал в каталитическом режиме. В последующих работах эффективность конъюгата удалось значительно повысить путем введения в линкер остатка мочевины, $\tau_{1/2} \approx 5$ ч. Такая иРНКаза также была чувствительна к последовательности РНК в участке расщепления [241].

Не привели к успеху попытки расщепить РНК с помощью иРНКаз-конъюгатов, несущих 1,4-диаминобутильный, N-пропилимидазольный или гистаминовый остаток, на 3'-концевом фосфате адресующего олигонуклеотида [231].

Быстрое ($\tau_{1/2} \approx 2.5$ ч), селективное, каталитическое расщепление 96-звенной TAR РНК было показано иРНКазой, представляющей собой конъюгат ПНК и неамина [242]. Однако известно, что предшественник неамина – неомидин – проявляет высокое сродство к TAR региону HIV-1 РНК, обусловленное, вероятно, узнаванием специфичной третичной структуры

именно этой РНК. Таким образом, пока не ясно, будет ли такой тип конъюгатов эффективен против любой другой РНК.

Кроме имидазола, одним из наиболее перспективных соединений для расщепления РНК является трис(2-бензимидазолметил)амин [239,243], катализирующий расщепление фосфодиэфирной связи за счет нескольких гуанидиновых групп. Было создано несколько иРНКаз-конъюгатов трис(2-бензимидазолметил)амин с ДНК [244] и ПНК [245,246], которые оказались достаточно эффективными и характеризовались $\tau_{1/2}$ 12-17 ч. Для одной из этих иРНКаз была показана принципиальная возможность работать в каталитическом режиме, расщепляя на 100% 5-кратный избыток РНК-мишени в течение недели [245]. Результата удалось добиться использованием стратегии, обсуждаемой ранее – формирование в РНК-мишени петли, по которой происходит расщепление. Таким образом, принцип каталитического действия иРНКазы за счет расщепления по формируемой в РНК-мишени петле, показанный ранее для металл-зависимых иРНКаз, оказался справедлив и для металл-независимых. Тем не менее, металл-зависимые иРНКазы расщепляют РНК быстрее. Конъюгаты олигонуклеотидов с трис(2-бензимидазолметил)амином на данный момент не могут считаться перспективными для использования в терапевтических целях.

Вероятно, наилучшими металл-независимыми иРНКазами, если не учитывать пептид-содержащие иРНКазы, на данный момент являются конъюгаты олигонуклеотидов с имидазольными остатками. Как и в случае других типов иРНКаз, первые варианты имидазол-содержащих конъюгатов проявляли умеренную активность [247–249]. Конъюгаты с высокой скоростью расщепления РНК-мишени ($\tau_{1/2}$ 1.5-2 ч) удалось получить в серии работ [235,250], скорость-лимитирующим фактором было комплексообразование, а не расщепление. Стоит отметить, что высокие скорости расщепления наблюдались только для СА последовательностей, что хорошо согласуется с тем, что РНКазы А также расщепляет Руг-А связи со скоростью, более чем в 10 раз превышающей скорость расщепления Руг-Х связей. Так, конъюгаты направленные против других последовательностей, были на два порядка менее эффективны. К сожалению, для имидазол-содержащих конъюгатов не был продемонстрирован многооборотный гидролиз фосфодиэфирных связей.

1.7.5 Пептид-содержащие иРНКазы

В активном центре любой природной РНКазы содержится один или два остатка гистидина, а также остатки таких аминокислот, как лизин, треонин, глутамат, аргинин. Предполагается, что напрямую в катализе участвуют остатки гистидина, тогда как остатки других аминокислот выполняют вспомогательные функции, в частности, стабилизацию промежуточного пентакоординационного состояния фосфора. Однако в серии работ [251,252]

была показана рибонуклеазная активность коротких пептидов, состоящих из чередующихся остатков гидрофобных (аланин, лейцин) и основных (лизин, аргинин) аминокислот. Примечательно, что такие пептиды как poly(His) и poly(Arg-Glu-Glu), не содержащие гидрофобных аминокислот, не проявляли рибонуклеазной активности. Неактивными оказались также пептиды, искривленные вследствие введения остатка пролина или D-изомеров аминокислот. Таким образом, рибонуклеазная активность пептидов обеспечивается регулярной структурой чередующихся остатков гидрофобных и основных аминокислот. Отметим, что требуемая для расщепления длина пептида составила 20 аминокислот [251,252].

Впоследствии такие пептиды были использованы для создания олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК), обладающих рибонуклеазной активностью, т.е. иРНКаз [253–255]. Интересно, что в составе конъюгата был использован короткий пептид [LeuArg]₄-Gly, неактивный в свободном состоянии. Необходимо уточнить, что в указанных работах не ставилась цель создать именно сиквенс-специфичные иРНКазы. Созданные ОПК включали короткий олигонуклеотид, который не мог обеспечить сайт-направленного расщепления. Для нескольких ОПК была показана различная специфичность расщепления РНК: Рур-А или G-X. Один из конъюгатов, пер-16, можно считать сайт-направленной иРНКазой. Пер-16 включает пептид [LeuArg]₄-Gly и 16-звенный олигонуклеотид, направленный против тРНК-Lys. Степень расщепления РНК составила 55% за 24 ч. Значительным шагом вперед в развитии ОПК стало создание нескольких направленных против miR-21 ОПК, для которых было показано как эффективное расщепление миРНК-мишени *in vitro*, снижение уровня этой миРНК в клетках и снижение пролиферативной активности клеток RLS40 [256]. Таким образом, была доказана возможность создания препаратов на основе ОПК, работающих в клетках.

Рассматривая иРНКазы как один из типов РНК-расщепляющих агентов с терапевтическим потенциалом, следует отметить, что в таком качестве они на сегодняшний день уступают другим типам агентов, таким как: АСО, siРНК, рибозимы и ДНКзимы, на основе которых созданы и проходят клинические испытания десятки препаратов. Аналогичных препаратов на основе иРНКаз не существует, тем не менее, данное направление продолжает развиваться, создаются новые типы иРНКаз, причем среди них начинают преобладать металл-независимые иРНКазы [243–245,257]. Появляются работы, в которых показано расщепление клинически значимых РНК как металл-содержащими иРНКазами [258], так и металл-независимыми иРНКазами [257]. Среди последних особо выделяются олигонуклеотид-пептидные конъюгаты, для которых было показано расщепление клинически значимых miR-21 и miR-17 в культуре клеток [256,259]. Таким образом, именно ОПК представляют собой, на наш

взгляд, один из наиболее перспективных и активно развивающихся типов иРНКаз с точки зрения использования в терапевтических целях.

1.8 Механизм расщепления РНК

РНК в 10^5 - 10^6 раз менее стабильна, чем ДНК, что обусловлено наличием атома кислорода в 2'-положении ($\approx 1.4 \times 10^{-7}$ мин $^{-1}$ скорость трансэтерификации РНК при 37 °С, pH 7.4, 0.25 М К $^+$ и 0.005 М Mg $^{2+}$ против $\approx 10^{-12}$ мин $^{-1}$ скорость гидролиза ДНК) [260]. В результате атаки 2'-О атома фосфора образуется пятикоординационный переходный комплекс (Рис. 7) [214], представляющий тригональную бипирамиду. Атомы 2'-О и 5'-О занимают вершины пирамиды (апикальное положение), 3'-О и атомы кислорода, не участвующие непосредственно в образовании связи между нуклеотидами (здесь и далее несвязывающие атомы кислорода) образуют основание бипирамиды (занимают экваториальное положение). Атом, занимающий апикальное положение, может выйти из комплекса, в этом случае он называется уходящей группой. Возможны три пути дальнейшего развития реакции. Во-первых, реакция может идти в обратном направлении, уходящей группой становится 2'-О. Наличие этого пути крайне важно, поскольку обуславливает возможность лигирования фрагментов РНК. Второй вариант –

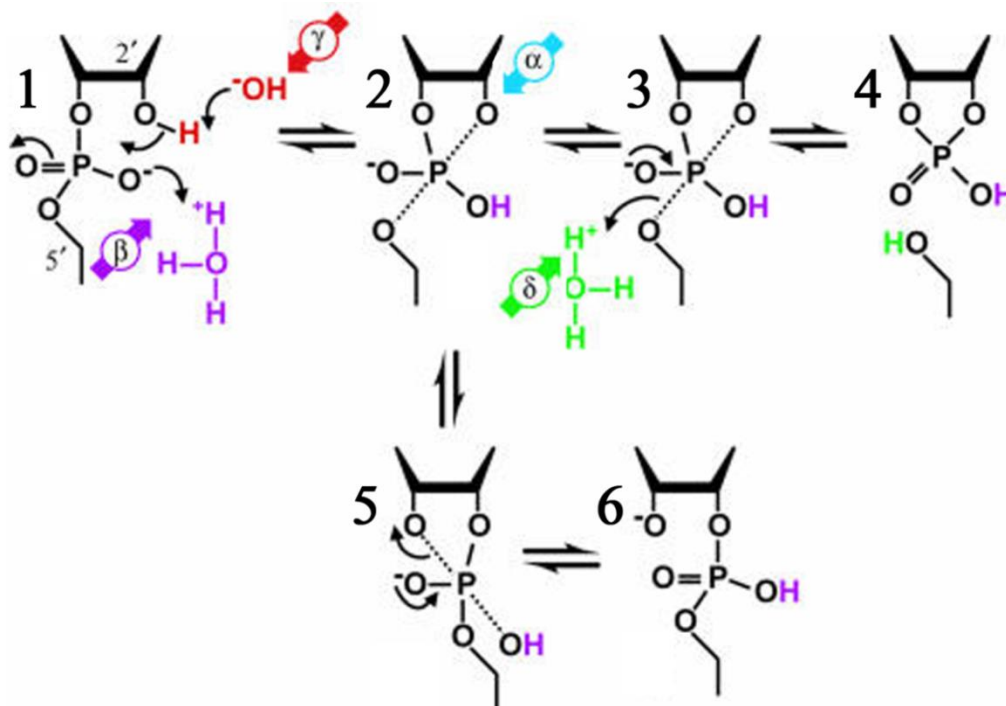


Рис.7. Механизм катализа реакции трансэтерификации. α -катализ – конформация «в линию»; β -катализ (обозначен фиолетовым) – нейтрализация отрицательного заряда на несвязывающем атоме кислорода; γ -катализ (обозначен красным) – депротонирование 2'-ОН-группы; δ -катализ (обозначен зеленым) – нейтрализация отрицательного заряда на 5'-атоме кислорода. Пунктирными линиями обозначены связи, соединяющие атомы, находящиеся в противоположных вершинах тригональной бипирамиды. Реакция идет по пути расщепления (структуры 3, 4) либо по пути изомеризации (5, 6) [214].

изменение структуры переходного комплекса (Рис. 7 2) в результате так называемой псевдоротации [261]. В новом комплексе 3'-О и один из несвязывающих атомов кислорода занимают апикальное положение, 3'-О становится уходящей группой, в результате образуется 2'-5'-фосфодиэфирная связь. Наконец, если в переходном комплексе 2 уходящей группой станет 5'-О, реакция пойдет по пути расщепления РНК (Рис. 7 3, 4). В последнем случае образуются два фрагмента РНК, причем один несет на 3'-конце 2'-3'-циклофосфат, второй на 5'-конце несет гидроксильную группу. 2'-3'-циклофосфат является активированной формой фосфата, поэтому легко вступает в реакцию образования фосфодиэфирной связи. Необходимо отметить, что в последней реакции возможно образование как 3'-5', так и 2'-5' связи [262].

Рассмотренные реакции, с одной стороны, обеспечивают химическую нестабильность РНК, что имеет огромное биологическое значение, например для быстрой деградации РНК в клетке. С другой стороны, эти же реакции обеспечивают возможность лигирования фрагментов РНК, например, при «сшивании» экзонов. Реакции расщепления и лигирования РНК могут проходить с достаточно высокой скоростью в отсутствие ферментов. В частности, константы скорости реакции расщепления различаются на несколько порядков в зависимости от рН [214]. Сильно изменяется скорость реакции в присутствии ионов некоторых металлов, например, ионов магния [263]. Следовательно, реакции расщепления и лигирования могут протекать в отсутствие ферментов. Возможно, именно эти реакции являются одним из механизмов обеспечивающих многообразие молекул РНК в том числе и в пребиотических условиях. Наконец, рассмотренные реакции обеспечивают расщепление РНК различными агентами, такими как рибозимы, ДНКзимы, иРНКазы.

1.8.1 Скорость реакции трансэтерификации и механизмы катализа

При рН 7 в отсутствие катализаторов константа скорости расщепления РНК составляет около 10^{-7} мин⁻¹, что соответствует периоду полупревращения, приблизительно равному 14 лет [264]. Рибонуклеазы и катализирующие расщепление рибозимы увеличивают константу скорости на несколько порядков. Так, например, панкреатическая рибонуклеаза А увеличивает константу скорости реакции минимум на 11 порядков. Период полупревращения в этом случае измеряется микросекундами [265]. Столь высокая эффективность объясняется тем, что фермент «использует» несколько стратегий, или механизмов катализа, действующих независимо друг от друга (за некоторыми исключениями, которые мы рассмотрим ниже) [214].

Выше мы рассмотрели механизм реакции расщепления РНК. Исходя из этого, можно определить факторы, влияющие на скорость реакции расщепления. Первый фактор – нуклеофильность 2'-кислорода. Чем более сильным нуклеофилом является атакующий

кислород, тем легче пройдет первая стадия реакции – образование переходного комплекса. Второй фактор – электрофильность атома фосфора, т.е. его способность подвергаться нуклеофильной атаке. Наконец, важную роль играет способность 5'-кислорода быть уходящей группой. Чтобы реакция завершилась расщеплением фосфодиэфирной связи 5'-О должен быть лучшей уходящей группой, чем 2'-О. Учитывая эти факторы, легко объяснить низкий уровень спонтанного расщепления РНК при нейтральном рН. На Рис. 7 1 представлена фосфодиэфирная связь при рН 7. 2'-О находится преимущественно в протонированной форме ($pK_a = 13$). Несвязывающие атомы кислорода делят резонансный отрицательный заряд и двойную связь с фосфором, в результате после нуклеофильной атаки оба несвязывающих атома кислорода несут отрицательный заряд. 5'-О уходит в форме оксоаниона и протонируется уже после расщепления. Таким образом, низкий уровень спонтанного расщепления при нейтральном рН объясняется, во-первых, слабой нуклеофильностью протонированного 2'-кислорода, во-вторых, сильным отрицательным зарядом уходящей группы и несвязывающих атомов кислорода. Легко увидеть возможные пути ускорения реакции: усиление нуклеофильности 2'-О путем его депротонирования (γ -катализ), нейтрализация отрицательного заряда несвязывающего атома кислорода (β -катализ) или кислорода уходящей группы (δ -катализ) [214].

Расщепление межнуклеотидной связи зависит также от взаимного расположения нуклеофила, электрофильного центра и уходящей группы. При линейной конформации 2'-О (нуклеофил), фосфор (электрофильный центр) и 5'-О (уходящая группа) находятся на одной прямой. Такая конформация в наибольшей степени способствует образованию переходного комплекса, соответственно, повышает скорость реакции. В одноцепочечном участке взаиморасположение указанных групп произвольно, линейная конформация может возникнуть только случайно с некоторой вероятностью. Таким образом, еще один механизм повышения скорости реакции расщепления – придание субстрату линейной конформации (α -катализ) [214].

Указанные механизмы могут быть реализованы как по отдельности, так и совместно в различных сочетаниях. Каждый механизм можно рассматривать как действующий независимо от других.

1.8.1.1 α -катализ

Подробно влияние пространственных факторов на скорость расщепления фосфодиэфирных связей было исследовано в работе [260]. Авторы исследовали кинетику расщепления четырех модельных молекул РНК, для каждой из которых была известна точная пространственная структура на уровне расположения отдельных атомов, полученная методами ядерного магнитного резонанса и рентгеноструктурного анализа. Эти данные были

сопоставлены с результатами спонтанного расщепления РНК. Всего было проанализировано 136 межнуклеотидных связей. Средняя константа скорости расщепления связей, расположенных в одноцепочечных участках («неограниченных» связей), составила $3 \times 10^{-6} \text{ мин}^{-1}$. Максимальная наблюдаемая авторами скорость составила $3.6 \times 10^{-5} \text{ мин}^{-1}$ для связи A12-U13 АТФ-аптамера, для которой наблюдалась конформация, максимально приближенная к конформации «в линию». Другими словами, скорость реакции возрастает в 12 раз по сравнению с «неограниченными» связями. В двуцепочечных участках скорость расщепления падает. Минимальная наблюдаемая скорость расщепления составила 10^{-8} мин^{-1} . Таким образом, итоговое увеличение скорости реакции за счет конформационных изменений составляет 10^3 [260].

Схожие выводы были сделаны в работе [213]. Авторы сравнивали скорость расщепления олигоаденилатов, содержащих только 2'-5' связи либо только 3'-5' связи в присутствии и в отсутствие полиУ. В отсутствие полиУ скорости расщепления олигонуклеотидов не отличались, что свидетельствует о том, что химическая стабильность обоих изомеров одинакова. При добавлении полиУ 2'-5' связи расщепляются приблизительно в 20 раз быстрее, тогда как скорость расщепления 3'-5' связей падает приблизительно в 50 раз. Предположительно, в образующемся комплексе полиУ/полиА 2'-5' связи в полиаденилате принимают конформации в линию. Отсюда можно заключить, что выгодная конформация ускоряет реакцию в 20 раз по сравнению с «неограниченными» связями и примерно в 10^3 раз по сравнению со связями, находящимися в невыгодной конформации [260].

По оценкам авторов работы [214], максимально возможное увеличение скорости реакции расщепления РНК за счет α -катализа по сравнению с «неограниченными» связями составляет 10^2 . Авторы исходят из посылки, что наиболее важны для принятия конформации в линию две связи: C3'-O3' и P-O3'. Соответствующие торсионные углы могут принимать любое значение с равной вероятностью. Если допустить, что «окно», соответствующее конформации в линию составляет 36° , то каждый из углов 10% времени находится в этом состоянии, а поскольку их два, то общая вероятность принятия выгодной конформации 1%. Таким образом, с использованием механизма α -катализа возможно увеличить скорость реакции не более чем на два порядка [214].

1.8.1.2 γ -катализ, δ -катализ и β -катализ

Механизм γ -катализа состоит в усилении нуклеофильности 2'О за счет депротонирования последнего (Рис. 7 1). При рН выше 5.5 γ -катализ является основным механизмом расщепления РНК. При более кислых условиях скорость определяется

комбинацией механизмов кислотного и основного катализа, при рН меньше 3 основную роль играет кислотный катализ [214]. Рассмотрим зависимость скорости расщепления РНК при щелочных значениях рН.

Линейная зависимость сохраняется, пока значения рН не достигнет pK_a для 2'-гидроксила. При этом число протонированных групп будет равно числу непротонированных, значит, максимальное увеличение скорости реакции возможно только в два раза. При рН значительно больше pK_a для 2'-гидроксила (в данном случае pK_a 13.1) скорость реакции не возрастает больше с ростом рН [264].

В интервале рН от 5.5 до 13 наблюдается линейное возрастание логарифма константы скорости расщепления (Рис. 8). Концентрация оксогрупп и, следовательно, скорость реакции возрастают в 10 раз при увеличении рН на единицу [214,264]. Скорость реакции возрастает в 10^8 раз при повышении рН от 5.5 до 13.5. Другими словами, 2'-оксоанион по крайней мере в 10^8 раз более сильный нуклеофил, чем 2'-гидроксил. В ряде исследований было отмечено, что механизм основного катализа продолжает действовать и в кислых условиях вплоть до рН 3 [266], значит, основной катализ может ускорить реакцию в 10^{10} раз. Эта оценка была подтверждена также экспериментально [267].

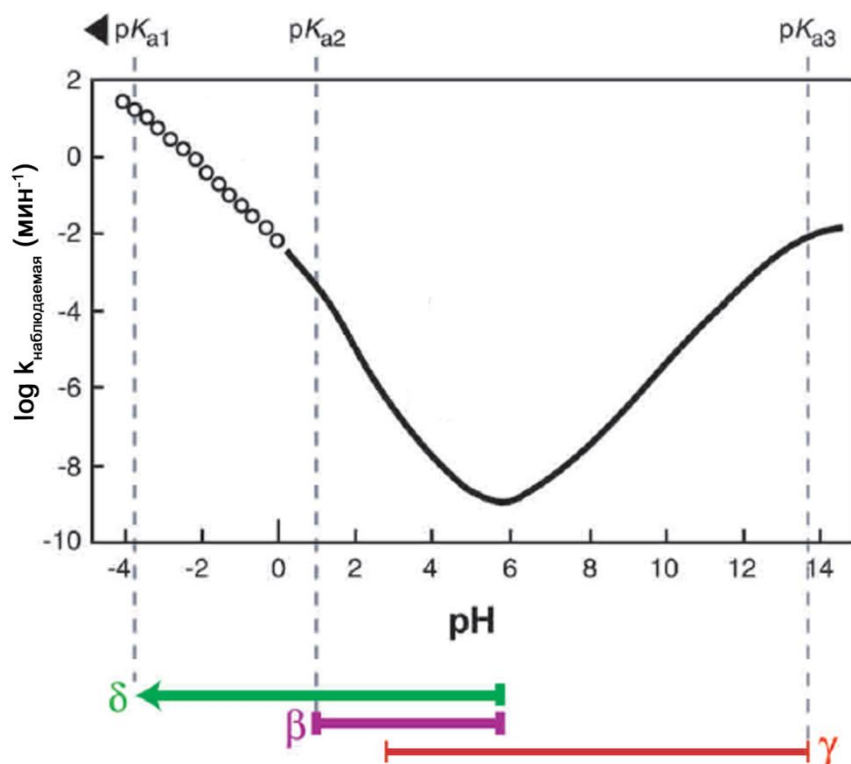


Рис. 8. Зависимость логарифма константы скорости расщепления РНК от рН. Внизу показаны диапазоны рН, при которых реализуются различные механизмы катализа [214].

δ -катализ и β -катализ относятся к кислотному типу катализа. Кислотный катализ расщепления РНК должен включать два независимых акта протонирования [214].

β -катализ – протонирование несвязывающего атома кислорода, что делает атом фосфора более доступным для нуклеофильной атаки. Максимальный эффект от β -катализа может быть оценен в 10^5 [214].

Существуют две альтернативные схемы, объясняющие кинетику расщепления РНК в кислых условиях: протонирование двух несвязывающих атомов кислорода [262] или протонирование одного несвязывающего атома кислорода и кислорода уходящей группы [214].

В работе [266] было показано, что 5'-гидроксил является значительно (в 10^5 раз) более плохой уходящей группой, чем 2' или 3'-гидроксил. Следовательно, расщепление РНК происходит предпочтительно если происходит протонирование 5'-гидроксил. Этот механизм называется δ -катализ. Перенос протона на 5'-гидроксил не может происходить в нестабильном дианионном состоянии структуры [268,269]. Поэтому протонирование 5'-гидроксил может происходить или до образования пентакоординационного комплекса, либо после протонирования несвязывающего атома кислорода. Согласно расчетам авторов [214] вероятность протонирования 5'-гидроксил до образования пентакоординационного комплекса исчезающе мала. Таким образом, протонирование 5'-гидроксил происходит только после протонирования несвязывающего атома кислорода [214].

Механизм δ -катализа действует в интервале рН 0-5.5. Соответственно, скорость реакции может увеличиваться в 10^5 - 10^6 раз за счет реализации этого механизма.

Описанные механизмы действуют независимо друг от друга, за исключением того, что для реализации δ -катализа требуется протонирование несвязывающего кислорода (β -катализ). Другими словами, максимально возможное улучшение скорости, достигаемое за счет одного механизма катализа, является фиксированным независимо от того, используются другие механизмы или нет. Профиль зависимости константы скорости расщепления от рН служит подтверждением этой гипотезы, поскольку он может быть объяснен тем, что на разных участках действуют независимо один, два или три фактора. Следствием же гипотезы является то, что результаты действия всех стратегий суммируется. Например, при рН 7 гипотетический фермент за счет реализации всех четырех стратегий одновременно теоретически может ускорить реакцию в 10^{19} раз ($10^2 \times 10^5 \times 10^6 \times 10^6$). Таким образом, высокая эффективность РНКаз может быть объяснена тем, что они используют несколько механизмов катализа одновременно [214].

Для того чтобы фермент мог осуществлять несколько стратегий катализа одновременно, требуется образование большого количества связей с субстратом в активном центре. Это ограничивает возможности изменения структуры РНК. Если при образовании фермент-субстратного комплекса не образуется конформации «в линию», то значительно снижается скорость реакции. Следовательно, для эффективного использования нескольких стратегий катализа одновременно, среди них должен присутствовать и α -катализ [214].

Рассмотренные механизмы используются по-отдельности или в различных сочетаниях белковыми ферментами, рибозимами и иРНКазами, катализирующими расщепление и лигирование РНК, а также обеспечивают спонтанное расщепление и лигирование РНК в кислых и щелочных условиях и в присутствии ионов металлов.

1.9 Заключение

Сайт-направленное расщепление РНК – активно развивающееся направление в медицине. В рамках этого направления существует несколько подходов: АСО, siРНК, рибозимы, ДНКзимы, иРНКазы. Первым по времени появления и наиболее хорошо разработанным подходом являются АСО, на втором месте – siРНК. На данный момент существует пять лекарственных препаратов на основе АСО и один на основе siРНК, причем два препарата были одобрены FDA за истекший год. Десятки препаратов находятся на разных стадиях клинических испытаний. К настоящему моменту полностью или частично разрешены многие проблемы, общие для всех РНК-расщепляющих агентов сайт-направленного действия, такие как чувствительность к нуклеазам, необходимость доставки в клетки, побочные эффекты.

К наиболее слабо разработанным подходам сайт-направленного расщепления РНК являются иРНКазы. Большинство существующих на данный момент иРНКаз относятся к группе металл-содержащих иРНКаз. Некоторые из них способны расщеплять целевую РНК с высокой скоростью, однако тенденция к потере иона металла не позволила создать на их основе ни одного терапевтического препарата. С нашей точки зрения, большой интерес представляют металл-независимые иРНКазы, до сегодняшнего дня находившиеся «в тени» АСО и siРНК. Учитывая большое разнообразие возможных каталитических групп и несколько вариантов общей структуры соединения, потенциал металл-независимых иРНКаз в качестве терапевтических агентов совершенно не исчерпан.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы

В работе использовали: LB агар, среду LB, имидазол, краситель “Stains-All”, этидий бромид, бромфеноловый синий, ксиленцианол, TEMED, рибонуклеозидтрифосфаты, цианоборогидрид натрия, фиколл, Tween-20 («Sigma», США), стрептомицин, ампициллин («Биохимик», РФ), ацетат натрия, уксусная кислота, акриламид, N,N'-метилен-бисакриламид, агароза, перхлорат лития, мочевины, цитрат натрия, хлорид натрия, хлорид калия (MP Biomedicals Inc), фенол, хлороформ, изоамиловый спирт, этанол, изопропанол, ацетон («Реактив», РФ), SDS, имидазол, персульфат аммония (Fluka, США).

Смесь BigDye и буфер для секвенирования для реакции терминации синтеза комплементарной цепи по Сэнгеру были предоставлены Центром коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

Прочие реактивы были качества «ACS Grade» или «ОСЧ».

[γ -³²P]-аденозин-5'-трифосфат ([γ -³²P]-АТФ) с удельной активностью ≈ 5000 Ки/ммоль (Томский Политехнический Университет).

Ферменты: рестриктазы Bst2UI, Fok I, щелочная фосфатаза (SibEnzyme, РФ), Taq ДНК-полимераза, T4 полинуклеотидкиназа, РНКазы А, РНКазы T1 (Fermentas, США), T7 РНК-полимераза (Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН).

2.1.2 Праймеры и олигодезоксирибонуклеотид ON-матрица

Таблица 6. Олигодезоксирибоолигонуклеотиды, использованные в работе. Курсивом выделен участок T7-промотора.

Обозначение	Последовательность 5'→3'
M2-96_for	<i>ACAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTACC</i>
M2-96_rev	<i>CGAGACAAAATGACTGTCGTCAGC</i>
Mfor	<i>CTACGGAAGGAGTACCTGA</i>
Mrev	<i>ATGACTGTCGTCAGCATC</i>
Hfor	<i>GAGATCCCTCAGACCACT</i>
ON-матрица	<i>CGATCCACAGCACTCACCGTCTAGAGTAAAGC</i>
M13/pUC_for	<i>GTAAAACGACGGCCAGT</i>
M13/pUC_rev	<i>CAGGAAACAGCTATGAC</i>

2.1.3 Плазмиды

Плаزمида р67YF0, содержащая последовательность фенилаланиновой тРНК из дрожжей, была любезно предоставлена к.х.н. Н.А. Моор (ИХБФМ СО РАН). Плазмиды рНIV2, содержащие фрагмент HIV-РНК, были любезно предоставлены профессором Г.Дж. Гроссом (Лаборатория Биохимии, Университет Вюрсбурга, Германия). Плазмиды рSVK3M2, содержащие фрагмент М2-РНК вируса гриппа, взята из коллекции Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, СО РАН.

2.1.4 Растворы и буферы

Таблица 7. Растворы и буферы, использованные в работе

Растворы и буферы	Состав
Буфер I	30 мМ КАс рН 5.0, 100 мМ КСI, 10 мМ СаСI ₂ , 50 мМ МпСI ₂ .
Буфер II	75 мМ СаСI ₂ , 10 мМ КСI, 10 мМ МОPS, 15% глицерин
Раствор 1	50 мМ глюкоза, 10 мМ ЕDТА, 25 мМ Трис-НСI рН 8.0
Раствор 2	0.2 М NaOH, 1% SDS
TE	10 мМ Трис-НСI рН 8.0, 1 мМ ЕDТА
TBE	90 мМ Трис-борат рН 8.3, 2 мМ ЕDТА
Буфер Y (SibEnzyme)	33 мМ Трис-ацетат рН 7.9, 10 мМ Mg(Ас) ₂ , 66 мМ КАс, 1 мМ DTT
Буфер G (SibEnzyme)	10 мМ Трис-НСI рН 7.6, 10 мМ MgСI ₂ , 50 мМ NaСI, 1 мМ DTT
T7-буфер	40 Трис-НСI рН 7.5, 16 мМ MgСI ₂ , 2 мМ спермидин, 10 мМ DDT
T4 ПНК буфер	50 Трис-НСI рН 7.6, 10 мМ MgСI ₂ , 0.1 мМ спермидин, 1 мМ DDT
Буфер D денатурирующий для РНКазы T1	6 М мочеви́на, 25 мМ цитрат натрия, рН 4.5-4.8, 1 мМ ЕDТА, 100 мг/мл суммарная тРНК E. coli
Буфер для имидазольного лэддера	2 М имидазол рН 7.0, 1 мМ ЕDТА, 100 мг/мл суммарная тРНК E. coli
Буфер T для расщепления РНК	50 мМ Трис-НСI рН 7.0, 200 мМ КСI, 1 мМ ЕDТА
Буфер T(Mg ²⁺) для расщепления РНК	50 мМ Трис-НСI рН 7.0, 200 мМ КСI, 5 мМ MgСI ₂ , 1 мМ ЕDТА
Буфер для элюции	0.3 М NaАс рН 5.0, 10% фенол рН 6.0
Раствор B для нанесения на ПААГ	8 М мочеви́на, 10 мМ ЕDТА, 0.05% бромфеноловый синий, 0.05% ксиленцианол
Буфер для нанесения на нативный ПААГ	20% фиколл, 0.05% бромфеноловый синий, 0.05% ксиленцианол
ПЦР буфер	67 мМ Трис-НСI рН 8.0, 16 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.5 мМ MgСI ₂ , 0.01%

	Tween-20
MMLV буфер	50 mM Трис-НСl pH 8.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , 10 mM DDT
Буфер для рекомбинации РНК	0.25 М бисТрис-пропан-НСl pH 8.0,
Буфер для дефосфорилирования	50 mM Трис-НСl pH 8.5, 0.1 mM EDTA
Раствор “Stains-All”	200 мг красителя “Stains-All” в 200 мл 50% водного формамида
Раствор бромистого этидия	0.002% бромистый этидий в воде

2.1.5 Олигонуклеотид-пептидные конъюгаты

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).

ОПК	Последовательность РНК-узнающего домена (-ов)	Последовательность пептида
Линейные ОПК		
P2-A-COOH	GATCGAACACAGGACCT	LRLRG
P4-A-COOH	GATCGAACACAGGACCT	LRLRLRLRG
P4G-A-COOH	GATCGAACACAGGACCT	LRLRGLRLRG
P4-A-CONH ₂	GATCGAACACAGGACCT	LRLRLRLRG
P4G-A-CONH ₂	GATCGAACACAGGACCT	LRLRGLRLRG
Двойные ОПК		
DC1	GATCGAACACAG/ TGGTGCGAATT	LRLRG
DC2	GATCGAACACAG/ TGGTGCGAATT	LRLRLRG
DC3	GATCGAACACAG/ TGGTGCGAATT	LRLRLRLRG
DC4	GTGATCGAACACAG/ TGGTGCGAATT	LRLRGLRLRG
DC5	GGATCGAACACAG/ TGGTGCGAATT	LRLRGLRLRG
DC6	GATCGAACACAG/ TGGTGCGAATT	LRLRGLRLRG
DC7	GATCGAACACAG/ TGGTGCGAATT	LRLRLRLRG
DC8	GATCGAACACAG/ CТААСТ	LRLRGLRLRG
DC9	GATCGAACACAG/ CGAATT	LRLRGLRLRG
DC10	GATCGAACACAG/ TGGTGCTААСТ	LRLRGLRLRG
DC11	GATCGAACACAG/ TGGTGCGGGTT	LRLRGLRLRG

Петлеобразующие ОПК		
BC2	TGGTGCGAATT-A*-GTGGATCGAA	LRLRLRLRG
BC3	TGGTGCGAATT-A*-TGGATCGAA	LRLRLRLRG
BC4	TGGTGCGAATT-A*-GGATCGAA	LRLRLRLRG
BC5	TGGTGCGAATT-A*-GATCGAA	LRLRLRLRG
BC2- α	TGGTGCGAATT-dR $^{\alpha}$ -GTGGATCGAACACAG	LRLRGLRLRG
BC3- α	TGGTGCGAATT-dR $^{\alpha}$ -TGGATCGAACACAG	LRLRGLRLRG
BC4- α	TGGTGCGAATT-dR $^{\alpha}$ -GGATCGAACACAG	LRLRGLRLRG
BC5- α	TGGTGCGAATT-dR $^{\alpha}$ -GATCGAACACAG	LRLRGLRLRG
BC5L- α	TGGTGCGAATT-dR $^{\alpha}$ -GATCGAACACAGGAC	LRLRGLRLRG

2.2 Оборудование

В работе использовали: качалку термостатированную KT104, центрифуги Centrifuge 5810 R, 5415 K, MiniSpin (Eppendorf), Centricon T42K (Kontron Instruments), системы геледокументирования PharosFX Plus Molecular Imager (Bio-Rad) и Bio-Vision (Vilber Lourmat), вакуумный концентратор Concentrator 5301, ДНК-амплификатор Mastercycler pro S (Eppendorf), лампа УФ переносная, трансиллюминатор (Vilber Lourmat), pH-метр SevenEasy (Mettler Toledo), весы ViBRA-SJ220CE (ViBRA), спектрофотометр BioMate 3S (Thermo), камера для вертикального электрофореза Kodak BioMax (Kodak), источники постоянного тока Consort E833 (CONSORT nv) и LKB Bromma 2297 (LKB Bromma), микротермостат (Бис-Н). Все растворы и реакционные пробы готовили с использованием автоклавированной воды, очищенной на установке MilliQ (Millipore) или Synergy UV.

2.3 Методы

2.3.1 Получение компетентных клеток *E. coli* штамма TOP10

Клетки *E. coli* штамма TOP10 (устойчивость к стрептомицину) после оттаивания на льду высевали на чашку с LB агаром, содержащем 100 мкг/мл стрептомицина, методом истощающего штриха для получения одиночных колоний. Одиночной колонией засевали 5 мл среды LB, инкубировали при 37°C и 180 об/мин в течении 14 ч. Ночной культурой засевали 200 мл среды LB, инкубировали при 37°C и 180 об/мин до достижения культурой оптической плотности 0.28 при длине волны 550 нм, после чего инкубировали колбы на льду 10 мин и центрифугировали клетки 15 мин при 2000 об/мин (805 g) при 4°C на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810 R (ротор A-4-81). После удаления надосадочной жидкости осадок ресуспендировали в 80 мл буфере I, инкубировали 5 мин на льду и центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин (805 g) при

4°C. Удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 80 мл буфере П, инкубировали 15 мин на льду, делали аликвоты полученных клеток объемом 100 μ л и хранили при -70°C.

2.3.2 Трансформация компетентных клеток *E. coli* штамма TOP10 плазмидой p67YF0, pHIV-2 или pSVK3M2

Компетентные клетки *E. coli* штамма TOP10 размораживали на льду 20 мин. Добавляли к ним 100 пг плазмиды p67YF0 в объеме 10 μ л, инкубировали клетки на льду 30 мин. Тепловой шок проводили 40 секунд при 42°C, после чего переносили клетки на лед на 2 мин. Переносили клетки на комнатную температуру и добавляли 1 мл LB, прогретый предварительно до 37°C. Инкубировали 1 ч при 37°C и 180 об/мин, затем высевали на чашки Петри с LB агаром, содержащем 100 μ г/мл ампициллина. Инкубировали чашки 14 ч при 37°C.

2.3.3 Выделение плазмиды p67YF0, pHIV-2 или pSVK3M2

Для выделения плазмидной ДНК использовали метод щелочного лизиса. Выращивали ночную культуру в объеме 500 мл в LB среде, содержащей 2 μ г/мл ампициллина. Центрифугировали клетки 15 мин при 4000 об/мин (3220 g) при 4°C. Удаляли надосадочную жидкость, осадок суспендировали в 6 мл раствора 1. Добавляли 4 мл раствора 1 с лизоцимом. Итоговая концентрация лизоцима 10 мг/мл. Инкубировали 20 мин при на льду, добавили 20 мл раствора 2, мягко перемешивали, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Добавили 15 мл 3 М NaAc pH 5.0, инкубировали 10 мин на льду. Центрифугировали 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C. К надосадочной жидкости добавляли 0.8 объема изопропанола, через 10 мин Центрифугировали 15 мин при 13 000 об/мин при 20°C. Осадок дважды промывали 75% этанолом, после высушивания растворяли в 3 мл TE \times 1. Добавляли 3 мл 5М LiCl, центрифугировали 1 ч при 13 000 об/мин и 4°C. Осадок растворяли в 0,5 мл TE \times 1, добавляли RNКазы А до 10⁻⁹ М, инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Осаждали добавлением 0,5 мл 1,6 М NaCl, 13% PEG8000. Центрифугировали 5 мин при 13 000 об/мин при 4°C. Осадок растворяли в TE \times 1, дважды промывали серным эфиром, добавляли 3М NaAc pH 5.0 и 3 объемов 96% этилового спирта. Осаждали центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в 200 мкл воды. Хранили при -20°C.

2.3.4 Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях

Для разделения фрагментов РНК использовали электрофорез в 10-12% полиакриламидном геле при соотношении акриламид: N,N'-метилден-бисакриламид = 20 : 1, в денатурирующих условиях (в присутствии 8 М мочевины) в буфере TBE при напряженности электрического поля 30-45 В/см.

2.3.5 Электрофорез в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1.0-1.5%-ном агарозном геле в буфере TBE при напряженности электрического поля 20 В/см.

2.3.6 Электрофорез в ПААГ в нативных условиях

В экспериментах по определению связывания олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с РНК использовали электрофорез в ПААГ в нативных условиях (метод задержки в геле). Сразу после окончания инкубации к каждой реакционной смеси добавляли 8 мкл буфера для нанесения (20% фиколл, 0.05% бромфеноловый синий, 0.05% ксиленцианол); по 10 мкл такого раствора наносили на нативный 10% ПААГ (соотношении акриламид: N,N'-метилден-бисакриламид = 20 : 1), уравновешенный при 4°C. Электрофорез проводили при 4°C и напряженности электрического поля 20 В/см.

2.3.7 Линеаризация плазмид p67YF0, pHIV-2

Реакционная смесь для линеаризации плазмид p67YF0 и pHIV-2 объемом 400 мкл содержала 100 мкг соответствующей плазмиды, буфер G и рестриктазу Bst2UI из расчета 10 ед. акт./мкг плазмидной ДНК или буфер Y и рестриктазу Fok I из расчета 1.5 ед. акт./мкг плазмидной ДНК, соответственно. Реакцию проводили в течении 4 ч при 37°C (pHIV-2) или 60°C (p67YF0). Полноту гидролиза ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Реакционные смеси последовательно экстрагировали смесью фенол:хлороформ = 1:1, затем дважды хлороформом. ДНК осаждали этанолом в присутствии 0.3 М Na-ацетата, pH 5.0, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в воде. Хранили при -20°C.

2.3.8 Амплификация фрагмента плазмиды, содержащей pSVK3M2, содержащей последовательность M2-РНК вируса гриппа

Плазмиду pSVK3M2, содержащую последовательность кДНК M2 вируса гриппа, использовали для амплификации требуемого фрагмента M2-РНК (праймеры M2-96_for и M2-96_rev). Праймер M2-96_for содержал на 5'-конце последовательность T7-промотора, необходимого для последующего проведения реакции T7-транскрипции. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала ПЦР-буфер, по 0.2 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.3 мкМ праймеры M2-96_for и M2-96_rev, 0.5 мкг/мл плазмиды pSVK3M2 и 5 ед. акт. *Taq* ДНК-полимеразы.

Амплификацию проводили в следующих условиях: 1 цикл: 95°C/3 мин; 52°C/1 мин; 72°C/1.5 мин; затем 30 циклов: 94°C/1 мин; 52°C/1 мин; 72°C/1 мин. Продукты амплификации последовательно экстрагировали смесью фенол:хлороформ = 1:1, затем дважды хлороформом.

ДНК осаждали этанолом в присутствии 0.3 М Na-ацетата, рН 5.0, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в воде. Хранили при -20°C.

2.3.9 Получение РНК с помощью транскрипции *in vitro*

Синтез РНК *in vitro* проводили с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7. В качестве ДНК-матриц использовали линейризованные плазмиды р67YF0 и рНIV-2 и 121-звенный ПЦР продукт, получаемый амплификацией с плазмиды рSVK3M2. Реакционную смесь объемом 100-400 мкл, содержащую Т7-буфер, 2-4 мМ рибонуклеозидтрифосфаты (АТР, ГТР, СТР, ТТР), 5 мМ ДТТ, 100 нг/мкл линейризованной плазмидной ДНК или ПЦР-продукта и 10 ед. акт./мкг ДНК-матрицы Т7-РНК-полимеразы, инкубировали при 37°C в течение 3 ч. По истечении времени инкубации реакцию последовательно экстрагировали смесью фенол:хлороформ = 1:1, затем дважды хлороформом. РНК осаждали этанолом в присутствии 0.3 М Na-ацетата, рН 5.0, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в воде. Затем к раствору добавляли раствор В, денатурировали 5 мин при 70°C и наносили на 8% денатурирующий ПААГ. Положение полосы РНК в геле определяли по поглощению УФ излучения. РНК элюировали из геля в 2.4 мл буфера А в течении 4 ч при 4°C, осаждали этанолом при -20°C в течение 10-12 ч. Осадок РНК отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, высушивали, растворяли в воде. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. Чистоту и гомогенность РНК контролировали с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ.

2.3.10 Дефосфорилирование фрагментов РНК щелочной фосфатазой

Реакционную смесь объемом 50 мкл, содержащую 8 мкг М2-РНК или НIV-РНК, буфер для дефосфорилирования и 1.5 ед. акт. щелочной фосфатазы инкубировали 45 мин при 37°C, после чего добавляли дополнительно 1.5 ед. акт фермента и инкубировали 45 мин. По завершении инкубации реакцию последовательно экстрагировали смесью фенол:хлороформ = 1:1, затем дважды хлороформом. РНК осаждали этанолом в присутствии 0.3 М Na-ацетата, рН 5.0, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в воде.

2.3.11 Неферментативная реакция расщепления/лигирования РНК в присутствии ионов магния

Реакционные смеси объемом 30 мкл, содержащие буфер для рекомбинации РНК, по 0.5 мкМ М2-РНК и НIV-РНК (дефосфорилированные и недефосфорилированные), 1 мкМ ON-

матрицу и 5 мМ MgCl₂, инкубировали в течении 3 суток при 37°C. По окончании инкубации реакцию останавливали добавлением EDTA в концентрации, равной концентрации ионов магния, осаждали РНК этанолом в присутствии 0.3 М Na-ацетата, рН 5.0, и 10 мкг/мл гликогена, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в воде.

2.3.12 Синтез кДНК с продуктов неферментативной реакции расщепления/лигирования фрагментов HIV-РНК и M2-РНК (обратная транскрипция)

Обратную транскрипцию проводили с использованием M-MuLV ДНК-полимеразы. Реакционная смесь содержала 1.25 мкМ специфический праймер, 0.01 мкг/мкл РНК-матрицы (1 мкл реакционной смеси после реакции расщепления/лигирования РНК). Объем реакционной смеси доводили водой до 12 мкл, денатурировали 5 мин при 70°C, быстро помещали на лед на 3 мин. После этого добавляли дезоксирибонуклеозидтрифосфаты до концентрации 1 мкМ, M-MuLV буфер (буфер Г), доводили объем водой до 18 мкл, инкубировали 5 мин при 37°C, добавляли 20 ед. акт. M-MuLV ДНК-полимеразы и инкубировали 60 мин при 42°C. По окончании реакции фермент инактивировали инкубацией при 70 °С в течении 10 мин. Полученные кДНК использовали в реакции ПЦР.

2.3.13 Амплификация продуктов обратной транскрипции

Смесь продуктов обратной транскрипции использовали для амплификации рекомбинантных продуктов реакции расщепления/лигирования с использованием соответствующих пар праймеров из набора: Mfor, Mrev, Hfor. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала ПЦР-буфер, по 0.25 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (каждого), 0.8 мкМ праймеров (прямой и обратный), 1 мкл продукта обратной транскрипции в разбавлениях 1:1 и 1:10⁻³, 2 ед. акт. Taq ДНК-полимеразы. Амплификация проводилась по следующей программе: 1 цикл: 95°C/3 мин; 56°C/1 мин; 72°C/1.5 мин; затем 25 циклов: 94°C/1 мин; 56°C/1 мин; 72°C/1 мин; 1 цикл: 94°C/1 мин; 56°C/1 мин; 72°C/10 мин. В аналитическом варианте к продуктам ПЦР добавляли раствор Б, денатурировали 5 мин при 70°C и наносили на 10% денатурирующий ПААГ. В препаративном варианте использовали смесь для ГА-клонирования.

2.3.14 Частичный гидролиз ДНК в денатурирующих условиях

Реакционную смесь объемом 30 мкл, содержащую 10 мкл [5'-³²P]-ДНК и 20 мкл 3% раствора дифениламина в муравьиной кислоте, инкубировали при 37°C в течение 5 и 10 мин. По окончании реакции добавляли 100 мкл воды и проводили двухкратную экстракцию реакционной смеси 300 мкл эфира. ДНК из водной фазы осаждали 10 объемами 2%-ого

раствора перхлората лития, осадок отделяли центрифугированием при 13000 об/мин, 15 мин, промывали ацетоном, высушивали, растворяли в воде и добавляли в раствор для нанесения.

2.3.15 ТА-клонирование

Клонирование ПЦР-продуктов в ТА-вектор проводили с помощью набора «InsTAclone™ PCR Cloning Kit» (Fermentas) согласно протоколу фирмы-производителя.

Фрагменты ДНК, полученные амплификацией продуктов обратной транскрипции с помощью *Taq* ДНК-полимеразы и содержащие липкие однонуклеотидные 3'-А-концы, встраивали в рTZ57R/Т вектор, представляющий собой линейризованную плазмиду с липкими однонуклеотидными 3'-ddT-концами. Реакционную смесь (30 мкл), содержащую вектор рTZ57R/Т (0.18 пмоль Т-концов), буфер для лигирования, ПЦР-продукт (0.54 пмоль А-концов), Т4-ДНК-лигазу (5 ед. акт.), инкубировали в течении ночи при 4°C, после чего вновь добавляли Т4-ДНК-лигазу (5 ед. акт.) и инкубировали при комнатной температуре 1 ч.

Полученные продукты лигирования использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*.

2.3.16 Анализ рекомбинантных продуктов методом ПЦР с бактериальных колоний

Анализ рекомбинантных клонов проводили с помощью ПЦР с бактериальных колоний, с использованием праймеров M13/pUC_for и M13/pUC_rev, направленных к участкам плазмиды рTZ57R/Т, находящимся на расстоянии 37-53 и 85-101 нуклеотидов от границ ПЦР-вставки. ПЦР-смесь объемом 20 мкл содержала ПЦР-буфер, праймеры (0.3 мкМ), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (0.2 мМ) и *Taq* ДНК-полимеразу (2 ед. акт.). Фрагмент анализируемой колонии помещали в ПЦР-смесь, после чего проводили амплификацию по программе: 1 цикл: 95°C/3 мин; 27 циклов: 94°C/0.5 мин; 51°C/0.5 мин; 72°C/1 мин. Анализ длин ПЦР-продуктов и их селекцию проводили после разделения в 10% ПААГ.

2.3.17 Определение нуклеотидной последовательности участков плазмиды

Определение первичной последовательности участков плазмиды рTZ57R/Т, содержащей вставку, проводили путем автоматического секвенирования ДНК по Сэнгеру. Реакционные смеси объемом 30 мкл, содержащие буфер для секвенирования, 1.5 мкл красителя BigDye v.1.1 (Applied Biosystems), 5 пкмоль праймера M13/pUC_for или M13/pUC_rev и плазмиду в количестве 300-500 фмоль, амплифицировали по программе: 1 цикл: 96°C/10 с; 3 цикла: 96°C/8 с, 64°C/4 мин; 5 циклов: 96°C/8 с, 60°C/4 мин; 17 циклов: 96°C/10 с, 50°C/5 с; 60°C/4 мин; 96°C/3 мин, 4°C – хранение. Не включившийся краситель BigDye удаляли путем осаждения изопропанолом. К реакционной смеси добавляли 30 мкл воды, 90 мкл изопропанола, инкубировали при комнатной температуре 25 мин, после чего центрифугировали 25 мин при

9000 об/мин на микрцентрифуге. Осадок дважды промывали 75% этанолом, высушивали в вакуумном концентраторе и передавали в ЦКП «Геномика».

2.3.18 Введение ^{32}P -метки в 5'-концевое положение РНК

Введение ^{32}P -метки в 5'-концевое положение РНК проводили с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и T4 полинуклеотидкиназы. Смесь объемом 10 мкл, содержащую буфер ПНК, 5 мкг РНК, 10 ед. акт. T4 полинуклеотидкиназы инкубировали 1 ч при 37°C или 18 ч при 4°C. 5'- $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-РНК}$ выделяли с помощью электрофореза в ПААГ, как описано выше.

2.3.19 Введение флуоресцентной метки на 3'-конец положению РНК

На первой стадии реакцию смесь объемом 50 мкл, содержащую 25 мкг РНК, 10% этанол, 20 мМ этилендиамин гидрохлорид, 1 мМ периодат натрия NaIO_4 , инкубировали 10 мин при 0°C в темноте, добавляли глицерин до 5%, инкубировали 30 мин при 37°C, добавляли NaNH_3CN до 75 мМ, инкубировали 30 мин при 25°C. По окончании реакции РНК осаждали этанолом в присутствии 0.3 М Na-ацетата, рН 5.0, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в 20 мкл воды. Добавляли 10 мкл триэтиламина, 60 мкл DMSO и 10 мкл 0.3 М FITC в DMSO. Инкубировали минимум 1 ч на шейкере при 25°C. По окончании реакции РНК осаждали этанолом в присутствии 0.3 М Na-ацетата, рН 5.0, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, промывали осадок 75% EtOH, растворяли в воде. Концентрацию 3'-FITC-РНК определяли спектрофотометрически. Чистоту и гомогенность 3'-FITC-РНК контролировали с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ.

2.3.20 Частичный гидролиз РНК

Для определения сайтов гидролиза при пробинге или расщеплении РНК ОПК в качестве маркеров использовали частичные гидролизаты РНК (лэддеры).

T1 лэддер: Реакционные смеси объемом 10 мкл, содержащие РНК и 9 мкл буфера D последовательно инкубировали при 55°C в течении 10 мин, при 0°C в течении 1 мин. После денатурации РНК к пробам добавляли РНКазу T1 в количестве 0.3 ед. акт., 0.5 ед. акт и 0.7 ед. акт и инкубировали реакционные смеси при 55°C в течении 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 10×TBE. В качестве маркера использовали смесь гидролизатов, полученных при разных концентрациях РНКазы T1.

Имидазольный лэддер: Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 9 мкл буфера для имидазольного гидролиза инкубировали при 90°C в течении 20 мин. По окончании реакции пробы осаждали 10-кратным объемом 2%-ного перхлората лития в ацетоне, осадок отделяли

центрифугированием 15 мин при 13 000 об/мин при 4°C, высушивали и растворяли в буфере В. Продукты гидролиза использовали в качестве лэддера при анализе расщепления РНК ОПК.

2.3.21 Исследование связывания РНК с олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Связывание РНК-мишеней с ОПК исследовали с помощью метода задержки в геле. Реакционная смесь содержала РНК в концентрации 1 мкМ, один из ОПК в концентрации от 1 мкМ до 50 мкМ и буфер Т. Реакция проводилась при 37°C в течении 30 мин. Связывание анализировали с помощью электрофореза в нативном 10% ПААГ. Равновесная константа связывания K_a была рассчитана по уравнению $K_a = \alpha / [\text{конъюгат}](1 - \alpha)$, где α - степень связывания, [конъюгат] - концентрация конъюгата.

2.3.22 Расщепление РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Реакционную смесь объемом 5 мкл, содержащую меченую РНК в концентрации 1 мкМ, один из ОПК в концентрации от 1 мкМ до 50 мкМ, буфер Т инкубировали при 37°C в течении 1-72 ч. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК растворяли в буфере В. Продукты гидролиза анализировали разделением в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Отнесение сайтов гидролиза проводили сравнением с продуктами частичного гидролиза этой же РНК под действием РНКазы Т1 и в 2 М рН 7.0 имидазольном буфере.

2.3.23 Расщепление РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами в условиях многооборотной реакции

Реакционную смесь объемом 5 мкл, содержащую меченую РНК в концентрации 10-20 мкМ, один из ОПК в концентрации от 1-5 мкМ, буфер Т инкубировали при 37°C в течении 1-72 ч. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2%-ного раствора перхлората лития в ацетоне, центрифугировали смесь 15 мин при 13 000 об/мин, осадок РНК растворяли в буфере В. Продукты гидролиза анализировали разделением в 12% ПААГ. Отнесение сайтов гидролиза проводили сравнением с продуктами частичного гидролиза этой же РНК под действием РНКазы Т1 и в 2 М имидазольном буфере.

2.3.24 Пробинг структуры РНК с помощью РНКазы А

Пробинг комплекса РНК с ОПК проводили с помощью РНКазы А. Реакционные смеси, содержащие буфер Т, РНК в концентрации 1 мкМ, один из ОПК в концентрации 20 мкМ, инкубировали в течении 30 мин, после чего добавляли РНКазу А до 10^{-9} М и инкубировали 10 мин. Продукты гидролиза анализировали в 12% денатурирующем ПААГ, как описано выше.

2.3.25 Моделирование структуры пептида [LRLRG]₂ с малеимидным и аминоксильным линкерами

Моделирование структуры пептида [LRLRG]₂ с малеимидным и аминоксильным линкерами осуществляли с помощью программного обеспечения MOE (Molecular Operating Environment). Частичные заряды для линкеров были получены с помощью модуля *resp* AMBER12. Молекулярно-динамическое моделирование проведено с помощью модуля *pmemd* AMBER12 в пять стадий: 1) 50 000 шагов минимизации; 2) 500 пс нагрев от 0 К до 310 К; 3) 1 нс равновесие; 4) 1 нс симуляция; 5) продуктивная симуляция. Параметры раствора были заданы в неявном виде с помощью модели The Generalized Born implicit solvation model. Шаг симуляции составил 2 фс. К ковалентным связям с участием атомов водорода применен алгоритм SHAKE.

Глава 3. Спонтанная и катализируемая олигонуклеотид-пептидными конъюгатами реакция трансэтерификации РНК

3.1 Рекомбинация РНК

3.1.1 Введение

Реакция расщепления РНК, так же как и обратная ей реакция лигирования, протекают по механизму трансэтерификации с участием 2'-кислорода. Образующийся в процессе расщепления 2',3'-циклофосфат является активированной формой фосфата и способен вступать в реакцию лигирования без дополнительных затрат энергии. Выше были подробно рассмотрены различные механизмы, ускоряющие данную реакцию, и установлено, что в качестве катализатора могут выступать ионы двухвалентных металлов, например, ионы Mg^{2+} . Ионы магния или любые другие катализаторы могут задействовать одновременно несколько механизмов катализа (β -, γ - и σ -катализ), ускоряя реакцию на несколько порядков. Указанные механизмы действуют в одинаковой степени на каждую фосфодиэфирную связь в молекуле РНК, однако, скорость расщепления по разным связям этого типа одной молекулы может различаться на порядки. Причина в том, что в районе расщепляемой связи должна сложиться конформация «в линию», при которой атомы 2'-О, Р и 5'-О располагаются на одной прямой. Линейная конформация обеспечивает протекание реакции трансэтерификации по механизму нуклеофильного замещения S_N2 , причем как в прямом (расщепление), так и в обратном (лигирование) направлениях. Если ферменты, такие как РНКаза А, могут индуцировать образование линейной конформации в сайте расщепления, то низкомолекулярные катализаторы, такие как ионы магния или протоны, могут только использовать связи, находящиеся в пригодной для расщепления конформации «в линию». Иначе говоря, катализируемое ионами Mg^{2+} расщепление происходит по «слабым» фосфодиэфирным связям, которые определяются не только ближайшим окружением, но и вторичной и третичной структурой РНК, в том числе ее отдаленными элементами. Таким образом, протекание реакции трансэтерификации (как расщепления, так и лигирования) происходит не произвольно, а по определенным участкам, определяемым структурой РНК. Выявление таких участков и связь их с вторичной и третичной структурой РНК и составляет задачу данного раздела. Структурные элементы РНК, такие как «шпильки», концевые и боковые симметричные и ассиметричные петли, узлы и псевдоузлы и их сочетания являются ключом, который позволит предсказать участки скопления «слабых» фосфодиэфирных связей РНК и, тем самым, выбрать наиболее удачную точку приложения РНК-расщепляющих агентов.

3.1.2 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 HIV РНК (здесь и далее М2-РНК и HIV-РНК) (Рис. 9). В использованной модели реакции расщепления и лигирования РНК пространственно не разделены и реакции происходят в одной системе при неизменных температуре, наличии катализатора (ионы магния) и концентрациях. Однако в дальнейших рассуждениях мы для удобства разделяем рекомбинацию на этапы расщепления и лигирования, чтобы более точно выявить характер процесса.

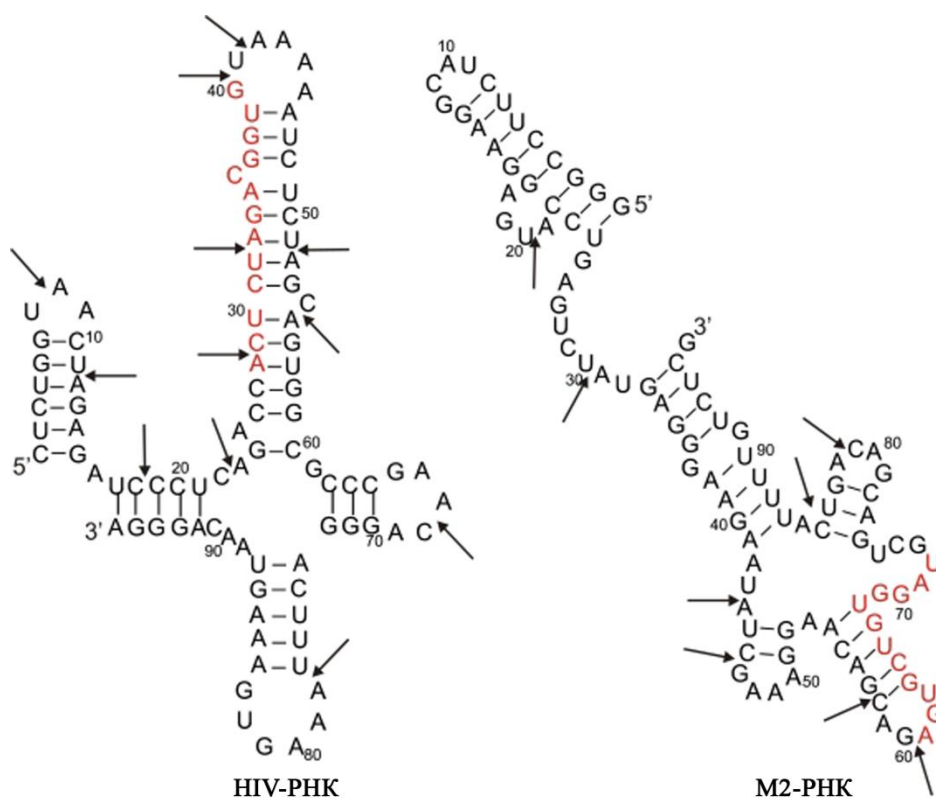


Рис. 9. Фрагменты HIV-РНК и М2-РНК, используемые как субстраты в реакции неферментативного расщепления/лигирования. Участки РНК, комплементарные ОН-матрице, обозначены красным. Стрелки показывают связи, в наибольшей степени подверженные расщеплению («слабые» связи).

В данной системе лигированию с участием 2',3'-циклофосфата будет предшествовать расщепление 96-звенных фрагментов РНК на более короткие и более пригодные для лигирования субстраты. На первом этапе молекулы РНК подвергаются расщеплению, катализируемому, в первую очередь, ионами магния, использующими несколько альтернативных механизмов катализа, кроме того, вклад в расщепление могут вносить также протоны и гидроксид-ионы. Любая РНК содержит «слабые» сайты – связи, в наибольшей

степени подверженные расщеплению. Локализация таких «слабых» сайтов в структуре M2 и HIV-РНК была проведена ранее (Рис. 9) [270,271]. Расщепление РНК происходит по механизму трансэтерификации, в результате реакции образуется набор фрагментов РНК, несущих на 3'-конце 2',3'-циклофосфат, являющийся активированной формой фосфата. Реакция лигирования, обратная реакции расщепления, приводит к формированию новой фосфодиэфирной связи. В системе отсутствуют агенты, индуцирующие образование 2'3'-циклофосфата, наподобие BrCN, EDAC, и т.д. [272–274].

Учитывая наличие большого количества слабых сайтов и, соответственно, разнообразие субстратов для лигирования, можно ожидать появление широкого спектра продуктов рекомбинации. В качестве факторов, влияющих на разнообразие формируемых рекомбинантных продуктов, мы использовали олигодезоксирибонуклеотид (ON-матрицу), частично комплементарную обоим фрагментам РНК и способный направлять реакцию рекомбинации РНК за счет сближения фрагментов РНК, а также 5'-дефосфорилированные РНК-субстраты. Предположительно, наличие в реакционной системе фосфорилированных РНК может привести к появлению дополнительных продуктов, поскольку 5'-ppp также является активированной формой фосфата [275].

Образование комплексов РНК с направляющим ON было проанализировано методом задержки в геле. M2-РНК и HIV-РНК инкубировали в присутствии 5'-³²p-ON при 37°C в течение 2 ч и 72 ч в присутствии ионов Mg²⁺ (Рис. 10). Через 2 ч инкубации формируется комплекс ON/M2-РНК, однако в этих условиях образования комплекса HIV-РНК-ON не происходит. При более длительной инкубации происходит формирование нескольких комплексов между фрагментами HIV-РНК и ON. В случае M2-РНК в течение 72 ч формируется один дополнительный комплекс. Проведенный анализ свидетельствует о более эффективном образовании комплекса ON с короткими РНК-фрагментами, образовавшимися в процессе расщепления РНК, чем с интактными РНК.

3.1.3 Схема реакции и метод идентификация продуктов рекомбинации.

Реакцию рекомбинации РНК проводили в буфере 50 мМ бисТрис-пропан-НСl, рН 8.0, в присутствии 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ON-матрицы, 0.5 мМ HIV- и 0.5 мМ M2-РНК в течение 3 суток при температуре 37°C. Скорость реакций расщепления и лигирования и, соответственно, выход продуктов зависит от ряда факторов, включая рН, температуру, наличие катализатора [272,274,276]. По данным [272], слабощелочные условия более благоприятны для реакции лигирования, чем для расщепления. Повышение температуры с 25°C до 37°C способствует

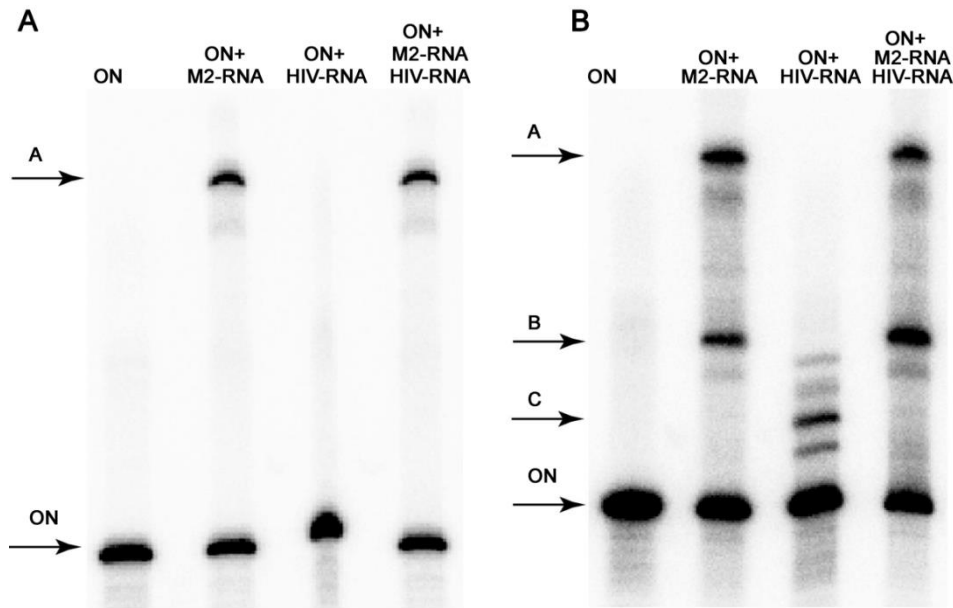


Рис. 10. Исследование формирования комплексов между 96-звенными фрагментами М2-РНК, HIV-РНК и олигонуклеотидом 5'-CGATC CACAGCACTCACCGTCTAGAGTAAAGC-3'. Радиоавтограф 12% нативного ПААГ. А. Инкубация 2 ч при 37°C в отсутствие Mg^{2+} . Б. Инкубация 72 ч при 37°C в присутствии Mg^{2+} . Олигонуклеотид (ON) и РНК указаны сверху. Основные дуплксы обозначены буквами А, В и С.

ускорению накопления продуктов лигирования [274,276]. Тем не менее, скорость накопления продуктов лигирования остается невысокой, и для накопления достаточного для детекции количества продуктов требуется несколько дней [272,274]. В качестве катализатора был использован Mg^{2+} в концентрации 5 мМ.

В исследуемой модельной системе реакция рекомбинации РНК может происходить различными путями, из которых два базовых – матрично-зависимый (Путь А, Рис. 11) и матрично-независимый (Путь Б, Рис. 11). Инкубация М2-РНК и HIV-РНК в присутствии ионов Mg^{2+} приводит к формированию пула фрагментов РНК, несущих 2',3'-циклофосфат на 3'-конце, причем эти фрагменты могут быть как свободными, так и в комплексе с ON-матрицей. Связывание активированных фрагментов с ON-матрицей приводит формированию двух типов комплексов. В комплексе типа 3(а) (Рис. 11 РНК-фрагменты могут вступать в реакцию лигирования, тогда как в комплексе типа 3(б) лигирование может происходить только после дополнительной стадии расщепления РНК. Как было установлено в результате исследования, подобный процесс происходит также и в отсутствие ON-матрицы: в этом случае роль ON-матрицы выполняют сами фрагменты РНК (3(с), 3(д)). Однако для удобства изложения в данной работе такой тип лигирования обозначен как матрично-независимый, при этом под матрицей подразумевается только олигонуклеотид ON.

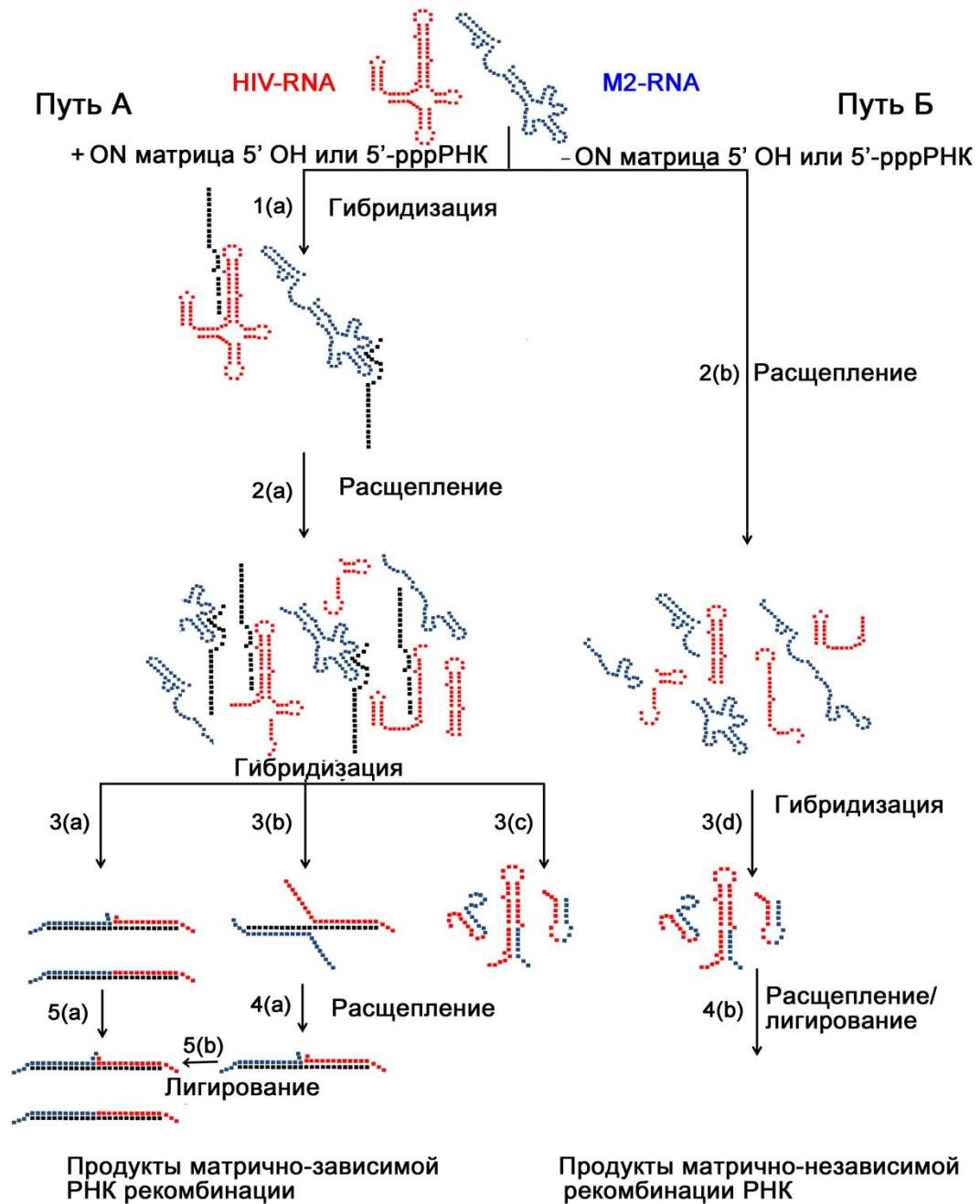


Рис. 11. Общая схема путей рекомбинации РНК в присутствии и в отсутствие ON-матрицы. Фрагменты, соответствующие HIV-РНК, показаны красным, M2-РНК – синим, ON - черным.

В описанной модели фрагменты как M2-РНК, так и HIV-РНК могут выступать в качестве и 3'- и 5'-субстратов. Таким образом, в реакции образуется четыре типа продуктов: 5'-M2-M2-3', 5'-HIV-HIV-3', 5'-HIV-M2-3', 5'-M2-HIV-3'. На данном этапе работы было решено ограничить идентифицируемые продукты какой-либо одной группой, в качестве которой была выбрана группа 5'-M2-HIV-3', поскольку только эта группа содержит как матрично-зависимые,

так и матрично-независимые продукты (Рис. 11), тогда как остальные группы включают исключительно матрично-независимые продукты.

Реакцию рекомбинации РНК проводили в нескольких вариантах. В экспериментальных сериях А и В были использованы 5'-ppp-НIV-РНК и 5'-ppp-M2-РНК, тогда как в сериях С и D РНК были предварительно дефосфорилированы. Реакционные смеси, соответствующие сериям А и С содержали ON-матрицу, в отличие от реакционных смесей серий В и D, ON-матрицу не содержащих. Таким образом, всего было поставлено четыре экспериментальных серии: А (5'-ppp+, ON+), В (5'-ppp+, ON-), С (5'-ОН, ON+), D (5'-ОН, ON-). Дополнительно на серии А был проверен эффект масштабирования: реакцию проводили в 30 μ л (серия А1) или в 100 μ л (серия А2). В качестве контроля использовали неинкубированные РНК: серии Е (ON+) и F (ON-) (Рис. 12).

Идентификация продуктов рекомбинации осуществлялась в несколько этапов. На первом этапе пул РНК использовали в качестве матрицы в реакции ОТ-ПЦР с последующим разделением продуктов в 10% ПААГ. Реакцию обратной транскрипции проводили с сиквенс-специфичным праймером Mrev. Затем проводили ПЦР с полученных кДНК с использованием праймеров Hfor and Mrev (H – HIV-РНК и M – M2-РНК специфичные праймеры). В ПЦР были использованы 5'-³²P-меченые Mrev праймеры. На рис. 12 представлен радиоавтограф ПААГ после разделения продуктов ПЦР, для получения которых в качестве матрицы была использована кДНК продуктов рекомбинации РНК, полученных в разных условиях. Дополнительно в качестве отрицательных контролей использовали: 1) ОТ-ПЦР в отсутствие какой-либо РНК; 2) ПЦР в отсутствие кДНК.

Продукты лигирования можно разделить на две основные группы: 1) те, которые образуются в любых реакционных условиях (группа X-9) и 2) те, которые образуются только в присутствии одного из ключевых компонентов реакции: ON-матрицы (X-1, X-2, X5 и X-6) и 5'-ppp-РНК (X1, X2, X3 и X4). Длина продуктов X-5, X-6, X-7 и X-8 близка к предполагаемой длине продуктов матрично-зависимого лигирования, хотя некоторые из них, как видно из рис. 12, могут образовываться также и в отсутствие матрицы.

Примечательной является серия С (ON+, 5'-ОН), в которой появляется только один продукт X-6. Формирование X-6 происходит с участием 2',3'-циклофосфата и в присутствии ON-матрицы. Примечательно, что по сравнению с серией А, в серии С из реакции исключили 5'-ppp, что привело к значительному сокращению набора продуктов рекомбинации.

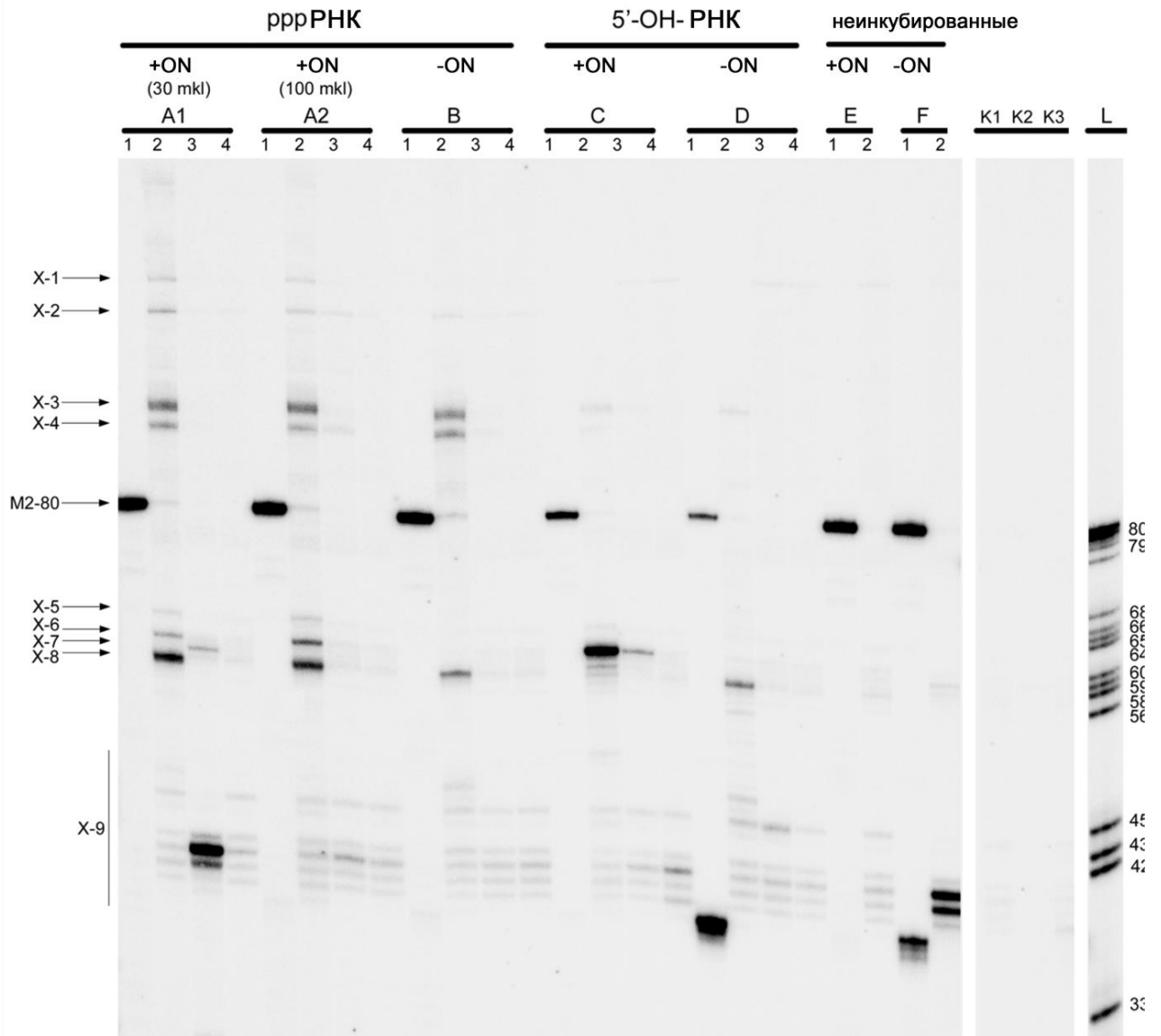


Рис. 12. Анализ с помощью ОТ-ПЦР с использованием $5'$ - 32 P- M_{rev} праймера продуктов рекомбинации фрагментов HIV- и M2-РНК. Радиоавтограф 10% денатурирующего ПААГ. В сериях «+» реакция рекомбинация была проведена в присутствии ON-матрицы, в сериях «-» в ее отсутствие. Дорожки «1»: положительный контроль ПЦР с праймерами M_{for}/M_{rev} (25 циклов ПЦР). Дорожки «2», «3», «4»: ПЦР с праймерами H_{for}/M_{rev} , с кДНК, разбавленной 1:1, $1:10^{-3}$, $1:10^{-6}$, соответственно (28 циклов ПЦР). В сериях «Е» и «F» использовали неинкубированные смеси РНК и матрицы для ПЦР. К1: отрицательный контроль ОТ-ПЦР с праймерами H_{for}/M_{rev} , обратная транскрипция проведена в отсутствии РНК. К2, К3: отрицательный контроль ПЦР в отсутствии кДНК с праймерами H_{for}/M_{rev} и M_{for}/M_{rev} (25 циклов ПЦР). L1: ДНК лэддер. Позиции предполагаемых продуктов матрично-зависимого лигирования показаны стрелками (X1-X9).

В сериях Е и F, соответствующим неинкубированной РНК, продукты рекомбинации не идентифицируются, за исключением продуктов X-9 в серии F, вероятно, соответствующим праймер-димерам.

3.1.4 ТА клонирование

Каждый ампликон, полученный на стадии ОТ-ПЦР, имеет два свисающих 3'-А конца, благодаря которым он может быть встроен в Т-вектор (Рис. 13). В качестве Т-вектора была использована линейризованная плазмида рTZ57R/Т, содержащая «липкие» однонуклеотидные 3'-ddТ концы, требуемые для связывания с ампликоном и его последующего лигирования в состав вектора при помощи Т4-ДНК-лигазы. Отбор бактериальных клеток, трансформированных плазмидой рTZ57R/Т, происходит на селективной среде с ампициллином, ген устойчивости к которой входит в состав вектора.

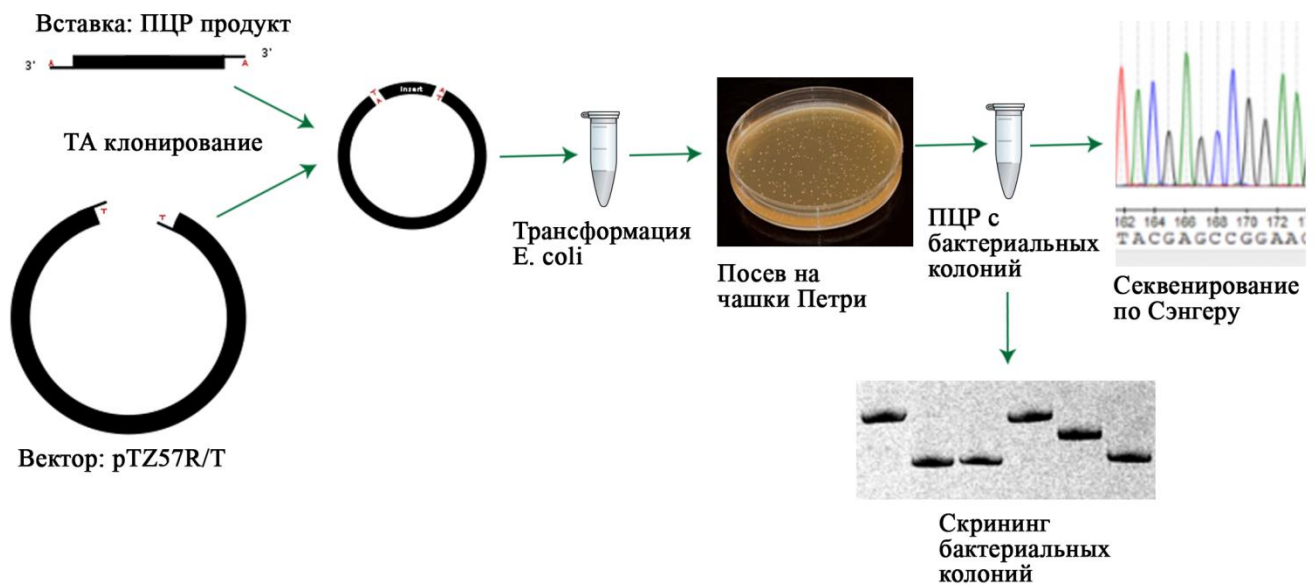


Рис. 13. Схема идентификации продуктов рекомбинации РНК с использованием пространственного разделения продуктов ОТ-ПЦР методом ТА клонирования с последующим посевом на чашки Петри для получения колоний, каждая из которых несет только одну вставку и, соответственно, один продукт рекомбинации РНК.

Поскольку клонирование проводилось смесью продуктов, полученных в реакции ОТ-ПЦР, в результате после лигирования был получен пул плазмид, несущих разные вставки. Полученный пул плазмид был использован для трансформации компетентных клеток *E. coli*, которые были высеваны и инкубированы на селективной среде, содержащей ампициллин. Каждая колония представляла собой потомство одной бактериальной клетки, содержащей плазмиду с одним типом вставки. Таким образом, было проведено пространственное разделение плазмид, несущих разные вставки. После скрининга колоний методом ПЦР с бактериальных колоний (Рис. 14) с выбранных колоний были выращены ночные культуры на среде с ампициллином, из которых была выделена плазмида в достаточном для секвенирования количестве.

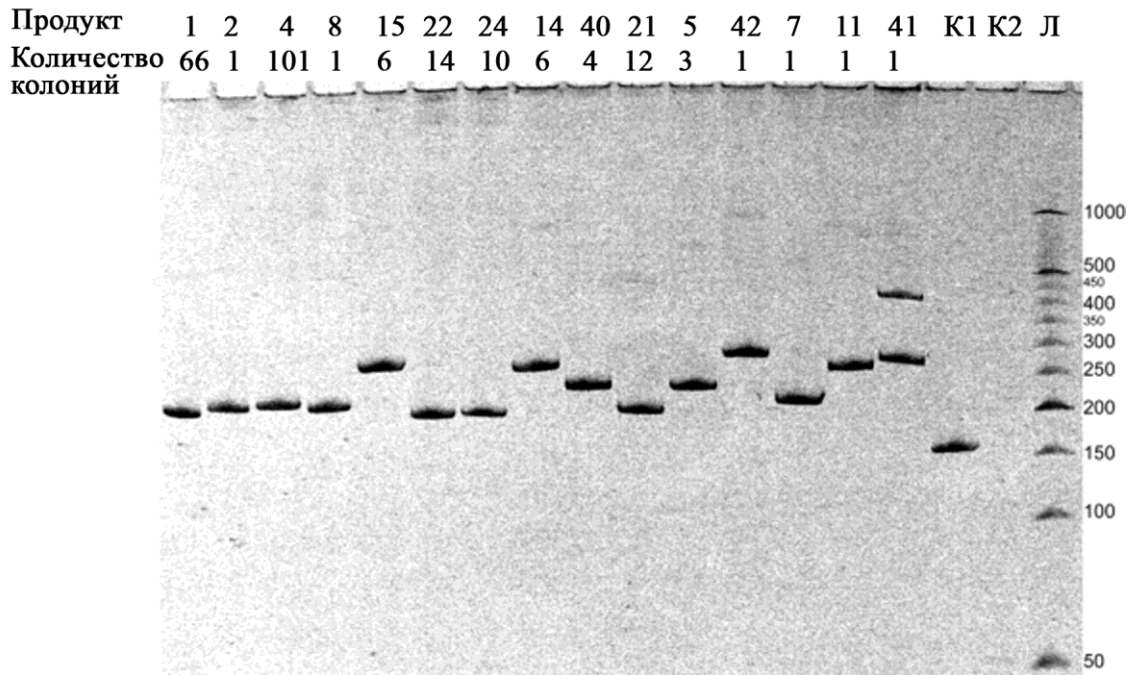


Рис. 14. Скрининг бактериальных колоний. Электрофорез, показывающий несколько типов продуктов рекомбинации РНК. Дорожки 1-15: продукты ПЦР с бактериальных колоний, полученные с использованием праймеров M13/pUC_for и M13/pUC_rev. K1: положительный контроль, ПЦР с плазмиды без вставки. K2: отрицательный контроль, ПЦР без матрицы. Л: ДНК лэддер. Сверху указаны тип продукта и соответствующее количество колоний.

Скрининг колоний проводили при помощи ПЦР с бактериальных колоний, характеризуя колонии по длине вставки в Т-вектор. Фрагменты колоний помещались в ПЦР-смеси, содержащие праймеры M13/pUC_for и M13/pUC_rev, фланкирующие вставку. Длина полученных ампликонов была равна сумме длин вставки переменной длины и участка плазмиды постоянной длины 154 п.н. В качестве положительного контроля была использована ПЦР, матрицей в которой служила циклическая плазида без вставки. Отрицательный контроль – ПЦР без матрицы.

Продукты ПЦР с колоний визуализировали в 8% ПААГ, окрашивая гель бромистым этидием. В результате анализа длин продуктов было выявлено 36 типов вставок. Часть продуктов имеют длину 55 н, соответствующую длине ожидаемого продукта лигирования «стык-в-стык». Длины других продуктов варьируют от 38 до 172 н. Один клон содержал две различные вставки в результате трансформации одновременно двумя плазидами (Рис. 14). Поскольку среди колоний было выявлено много клонов, содержащих вставки близкой длины, было проведено выборочное секвенирование последовательностей плазмид по участку вставки. Всего было проанализировано 379 колоний: 81 колония в группе А, 134 – в группе В, 106 – в группе С и 58 в группе F, из них секвенирование по Сэнгеру проведено для 35, 57, 27 и 19,

соответственно. Следует отметить, что для секвенирования выбирали фрагменты, покрывающие все разнообразие вставок по длине.

3.1.5 Классификация рекомбинантных продуктов

Полученные данные (Таблица 8) показывают, что разнообразие рекомбинантных молекул РНК очень велико. Некоторые продукты рекомбинации могут считаться основными (Pr-1, Pr-4, Pr-13, Pr-23), встречаясь в десятках колоний, другие были детектированы только в нескольких колониях (Pr-6, Pr-14, Pr-15). Наконец, были идентифицированы уникальные продукты, обнаруженные однократно (Pr-2, Pr-10, Pr-11). Каждый продукт был обнаружен в одной или нескольких экспериментальных сериях (А, В, С и F). Чтобы объяснить возможность появления каждого продукта, все они были объединены в несколько групп. Первый очевидный критерий для классификации продуктов – необходимость для его формирования ON-матрицы, по которому продукты делятся на матрично-зависимые и матрично-независимые. Группа G1 объединяет матрично-зависимые продукты (Pr-2 – Pr-9) лигирования, происходящего в боковых и внутренних петлях, формируемых при связывании фрагментов РНК с ON-матрицей. Все остальные продукты отнесены к матрично-независимым (группы G2 – G5), т.е. матрица не участвует в их формировании, хотя может присутствовать в реакционной смеси. Продукт Pr-1 стоит особняком, поскольку он может формироваться как в присутствии, так и в отсутствие матрицы, и выделен в отдельную группу G0.

Группа матрично-независимых продуктов оказалась, с одной стороны, оказалась весьма обширной, с другой – крайне неоднородной по составу. Так, несколько продуктов обладали сходной последовательностью и, совершенно очевидно, образовывали практически идентичную структуру. Соответственно, они были объединены в группу G2 (Pr-10 – Pr-19).

Группа G3 объединяет набор продуктов умеренной частоты встречаемости, распределенных по трем-четырем экспериментальным сериям. К ней же 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 и уникальные продукты.

3.1.6 Продукт Pr-1 (группа G0)

Особенность продукта Pr-1 (Таблица 8, Рис. 15А, Б) является то, что хотя его последовательность предполагает матрично-зависимое лигирование «стык-в-стык», он формируется не только в присутствии, но и в отсутствие ON-матрицы, причем в серии В (ON-) обнаружено почти в два раза больше колоний, содержащих Pr-1, чем в серии А (ON+). Более того, Pr-1 является главным продуктом в этой серии. Видимо, вступающие в реакцию

Таблица 8. Нуклеотидная последовательность продуктов рекомбинации HIV-РНК и М2-РНК в участке между H_{for} и M_{rev} ПЦР праймерами.

Группа	Продукт	Длина	Последовательность (между праймерами) ¹⁾	Число колоний в экспериментальной серии ²⁾				Комментарии
				A	B	C	F	
G0	Pr-1	55	[H _{FOR}] CUAGACGGUGAGUGCUGUG [M _{REV}]	21	37	1	7	Лигирование «стык-в-стык»
G1	Pr-2	56	[H _{FOR}] CUAGACGGUAGAGUGCUGUG [M _{REV}]			1		1 н петля
	Pr-3	56	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUAGUGCUGUG [M _{REV}]	1				1 н петля
	Pr-4	58	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUAGAGUGCUGUG [M _{REV}]	14		8 7		3 н петля
	Pr-5	76	[H _{FOR}] [H _{FOR}] CUAGACGGUGUAGAGUGCUGUG [M _{REV}]			3		3 н петля
	Pr-6	61	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUAGCAGAGUGCUGUG [M _{REV}]	2				6 н петля
	Pr-7	55	[H _{FOR}] CUAGACGGAGAGUGCUGUG [M _{REV}]			1		Симметричная 2 н петля
	Pr-8	54	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUUGCUGUG [M _{REV}]			1		Асимметричная 3 н петля
G2	Pr-9	58	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUAGAGUGCUGUG [M _{REV}]	5				3 н петля
								3'-свисающий конец (HIV)/ 5'- свисающий конец (M2)
	Pr-10	104	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGAUGAGGGAAGAAUAUCGAAAG GAACAGCAGAGUGCUGUG [M _{REV}]		1			-/A
	Pr-11	105	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGCGGAGGGAAGAAUAUCGAAAG GAACAGCAGAGUGCUGUG [M _{REV}]			1		CGC/-1
	Pr-12	105	[H _{FOR}] CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGUAUGAGGGAAGAAUAUCGA		3			-/UA

		AAGGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]					
Pr-13	106	[<i>H_{FOR}</i>] CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGU GGCGCUGAGGGAAGAAUAUCG AAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]	12	27			CGC/-
Pr-14	107	[<i>H_{FOR}</i>] CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAGCAGU GGCGCAUGAGGGAAGAAUAUC GAAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]		4	2		CGC/A
Pr-15	108	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCAUGAGGGAAGAAUAUCG AAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]		5	1		CGCC/A
Pr-16	109	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCAUGAGGGAAGAAUA UCGAAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]		10			CGCCC/A
Pr-17	110	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGAUGAGGGAAGAAUAU CGAAAGGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]		1			CGCCCG/A
Pr-18	105	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGCAUGAGGGAAGAAUAUCGAAA GGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]		4			C/A
Pr-19	104	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGCUGAGGGAAGAAUAUCGAAAG GAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]	7	6			C/-
G3	Pr-20	[<i>H_{FOR}</i>] G [<i>M_{REV}</i>]	4	1		1	
	Pr-21	[<i>H_{FOR}</i>] CUAGAC [<i>M_{REV}</i>]	4	6	2		5 н концевая петля
	Pr-22	[<i>H_{FOR}</i>] AU [<i>M_{REV}</i>]	2	3	1	8	
	Pr-23	[<i>H_{FOR}</i>] [<i>M_{REV}</i>]				2 6	
	Pr-24	[<i>H_{FOR}</i>] CUA [<i>M_{REV}</i>]	2	7	1		
G4	Pr-25	170	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGAACAGGGACUUUAAA GUGAAAGUAACAGGGGGGCCUUCUACG GAAGGAGUACCUGAGUCUAUGAGGGAA GAAUAUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCU	1			Лигирование с участием 5'-M2-РНК 8 н внутренняя петля

			GUG [M_{REV}]					
Pr-26	169		[H_{FOR}]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGAACAGGGACUUUAAA GUGAAAGU AACAGGGGGCCUUCUACGG AAGGAGUACCUGAGUCUAUGAGGGAAG AAUAUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCUG UG [M_{REV}]	2	2		1	Лигирование с участием 5'- M2-РНК 7 н внутренняя петля
Pr-27	169		[H_{FOR}]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGAACAGGGACUUUAAA GUGAAAGU AACAGGGGGCCUUCUACG G[A]AGGAGUACCUGAGUCUAUGAGGGA AGAAUAUCGAAAGGAACAGCAGAGUGC UGUG [M_{REV}]				1	Лигирование с участием 5'- M2-РНК 8 н внутренняя петля
Pr-28	172		[H_{FOR}]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGAACAGGGACUUUAAA GUGAAAGU AACAGGGGGGGCCUUCUA CGGAAGGAGUACCUGAGUCUAUGAGGG AAGAAUAUCGAAAGGAACAGCAGAGUG CUGUG [M_{REV}]				1	Лигирование с участием 5'- M2-РНК 10 н внутренняя петля
G5	Pr-29	39	[H_{FOR}] GAU [M_{REV}]		1			
	Pr-30	39	[H_{FOR}] GUG [M_{REV}]		1			1 н внутренняя петля
	Pr-31	44	[H_{FOR}] CUGCUGUG [M_{REV}]		4			6 н концевая петля
	Pr-32	45	[H_{FOR}] CUAGACGGU [M_{REV}]		1			1 н петля
	Pr-33	55	[H_{FOR}] [H_{FOR}] A [M_{REV}]		1			
	Pr-34	63	[H_{FOR}]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUGC UGUG [M_{REV}]		3			1 н от 6 н петли
	Pr-35	75	[H_{FOR}]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGCUGUG [M_{REV}]		3			6 н асимметричная внутренняя петля
	Pr-36	87	[H_{FOR}]CUACCUGAGUCUAUGAGGGAAGA AUAUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCU GUG [M_{REV}]		2			5 н концевая петля
	Pr-37	91	[H_{FOR}]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGUGUAUCGAAAGGAACAGCAGAGUG CUGUG [M_{REV}]	1				4 н внутренняя петля
Pr-38	133	[H_{FOR}]		1			перекресток	

		CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAGCAGU GGCGCCCGAACAGGGACUUUAAAGUGA AAGUAUGAGGGAAGAAUAUCGAAAGGA ACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]					
Pr-39	77	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGAACAGG [<i>M_{REV}</i>]	1				1 н петля
Pr-40	73	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAUCGAAAGGAAC AGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]			2		1 н петля
Pr-41	109	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGUGGCGCCCGAACAGGGACUUUAUC GGGAGGAACAGCAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]			1		AA заменен на GG в M2 участке
Pr-42	119	[<i>H_{FOR}</i>] CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAGCAGU GGCGCCCGAACAGGGACAUGAGGGAAG AAUAUCGAAAGGAACAGCAGAGUGCUG UG [<i>M_{REV}</i>]			1		перекресток
Pr-43	74	[<i>H_{FOR}</i>] CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAGCAG CGGTGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]	1				
Pr-44	42	[<i>H_{FOR}</i>] GCUGUG [<i>M_{REV}</i>]				5	4 н концевая петля
Pr-45	43	[<i>H_{FOR}</i>] CUAGACG [<i>M_{REV}</i>]				4	1 н петля
Pr-46	55	[<i>H_{FOR}</i>] [<i>H_{FOR}</i>] G [<i>M_{REV}</i>]				1	
Pr-47	57	[<i>H_{FOR}</i>] CUAGACGGUGUA GGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]				1	
Pr-48	61	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CA [<i>M_{REV}</i>]				1	Между двумя 1 н петлями
Pr-49	73	[<i>H_{FOR}</i>] [<i>H_{FOR}</i>] [<i>H_{FOR}</i>] G [<i>M_{REV}</i>]				1	
Pr-50	71	[<i>H_{FOR}</i>]CUAGACGGUGUAAAAAUCUCUAG CAGAGUGCUGUG [<i>M_{REV}</i>]	1				3 н петля

¹⁾ РНК участки, соответствующие HIV-РНК, показаны красным, M2-РНК – синим. Участки связывания с матрицей подчеркнуты. Последовательности праймеров обозначены [*H_{FOR}*] и [*M_{REV}*]. Вставки показаны желтым.

²⁾ Количество колоний, выявленное ПЦР с бактериальных колоний и подтвержденное секвенированием плазмид, распределено по четырем экспериментальным сериям (Рис. 12)

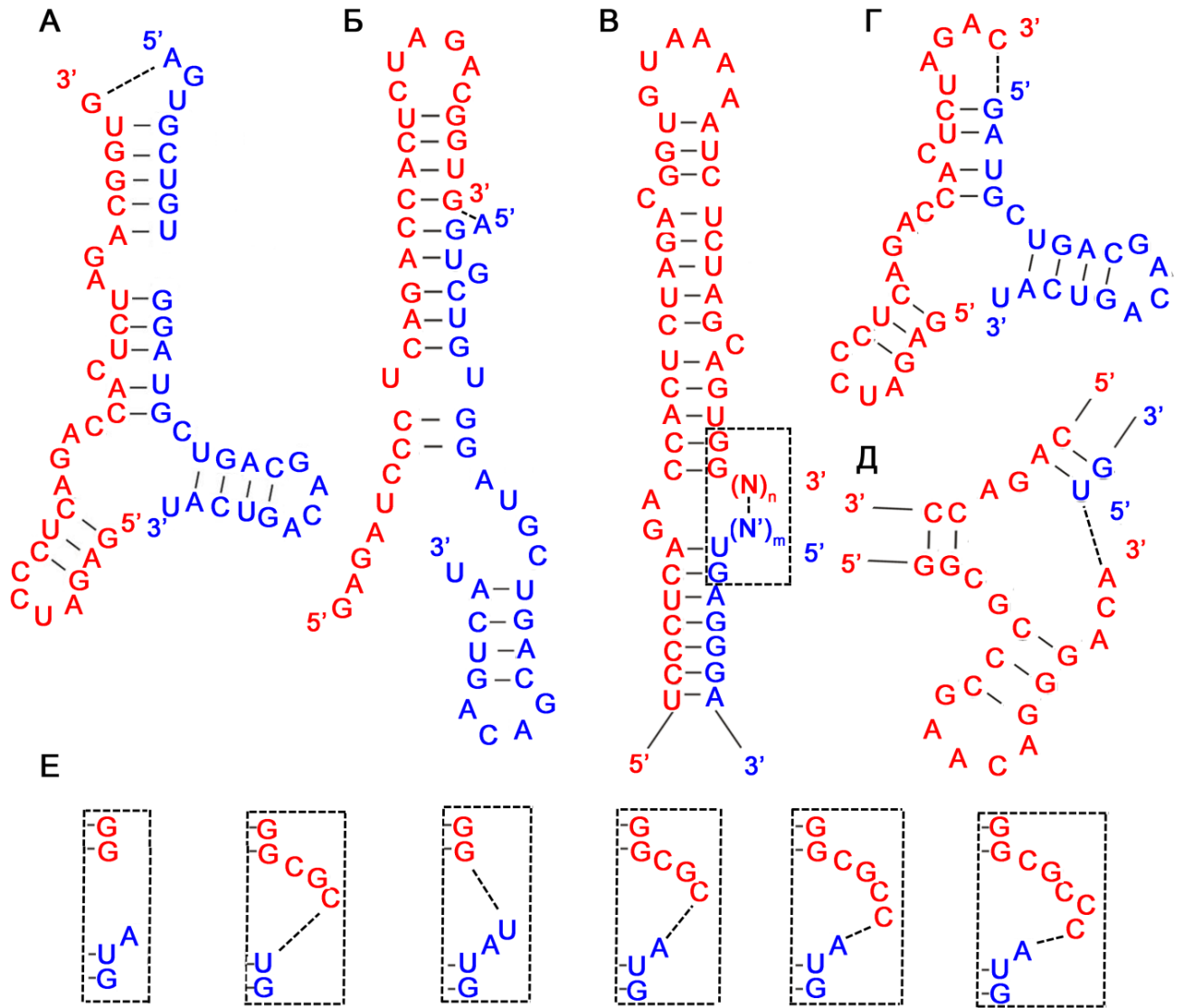


Рис. 15. Наиболее стабильные вторичные структуры Pr-1 (А и Б) (G0) и Pr-21 (Г) (G3). В. Общий домен Pr-10-Pr-19 (G2). N и N' указывают свисающие концы HIV-РНК и M2-РНК, n и m – число нуклеотидов (Таблица 1). HIV-РНК показаны красным, M2-РНК – синим. Д. Сайт лигирования Pr-42 (G5). Е. Варианты сайта лигирования G2 продуктов. Штрих-линия соединяет нуклеотиды, участвующие в реакции лигирования.

лигирования фрагменты образуют прочную третичную структуру, с большой вероятностью обеспечивающую лигирование. Программа RNAfold предлагает две альтернативные стабильные структуры для этого продукта (Рис. 15А, Б). В первой структуре лигирование происходит между свисающими концами с образованием концевой четырехзвенной петли, во второй образуется однонуклеотидная боковая петля. Вторая структура имеет сходство со структурой продукта матрично-зависимого лигирования Pr-2, но в случае Pr-1 (Рис. 15Б) матрицей служит участок HIV-РНК.

3.1.7 Продукты G-1

Данная группа включает восемь типов продуктов: Pr2-Pr9 (Таблица 8). Все они образуются исключительно в присутствии ON-матрицы. Лигирование происходит с образованием боковых петель разного размера: одно- (Pr-2, Pr-3), трех- (Pr-4, Pr-5) и шестинуклеотидных (Pr-6), а также двух- и трехнуклеотидных внутренних петель (Pr-7 и Pr-8, соответственно). Интересно, что наблюдается предпочтительное образование одного типа продукта (Pr-4), найденного в 87 колониях, тогда как все остальные продукты найдены в лучшем случае в 5 колониях. Можно допустить, что трехнуклеотидная боковая петля наиболее выгодна для реакции лигирования. Следует отметить, что среди полученных продуктов не встречаются такие структуры как, например, двух- и четырехзвенные боковые петли. Одно из возможных 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.

Матрица способствует формированию серии структур, в которых может протекать реакция трансэтерификации. В присутствии 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 (Рис. 11 Путь А), тем самым перекрывая, хотя и не полностью, путь матрично-независимой рекомбинации (Рис. 11 Путь Б).

3.1.8 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 (Таблица 8, Рис. 15В). Общая длина продуктов составляет 104-110 н. Продукты различаются структурой участка, в котором происходит лигирование. Длина свисающего или тупого 3'-конца HIV-РНК составляет 0-6 н, 5'-конец M2-РНК может быть свисающим (1-2 н) или тупым. Продукты этой группы представлены во всех экспериментальных сериях, кроме серии F (не инкубированная РНК).

Интересно распределение продуктов G2 по сериям: они чаще всего встречаются в серии В (46%, 61 колония из 134), менее представлены в серии А (23%, 19 колоний из 81) и редко встречаются в серии С (4 из 106). Разницу представленности продуктов G2 между А и В сериями можно объяснить тем, что присутствие матрицы сдвигает процесс рекомбинации в сторону образования матрично-зависимых продуктов. Слабую представленность продуктов G2 в С-серии объяснить труднее. Можно предположить, что G2 продукты образуются в несколько

стадий, включая промежуточное формирование продуктов, подобных Pr-25 и Pr-26, требующих присутствия 5'-ppp-M2-РНК.

Группа продуктов G2 является прекрасной иллюстрацией принципа «направленной рекомбинации», или принципа обусловленности протекания реакций расщепления/лигирования РНК по конкретным участкам, выбор которых определяется вторичной и третичной структурой РНК. В случае продуктов G1 формирование прочной структуры (точнее, структур) обеспечивается участием матрицы. В случае продуктов G2 протяженный, прочный домен HIV-РНК обеспечивает сохранение целого спектра близких структур на протяжении длительного времени, достаточного для протекания реакции лигирования. Более того, после реакции лигирования образуются структуры, также достаточно устойчивые и сохраняющиеся в течении времени, необходимого для их идентификации.

3.1.9 Продукты G-3

Группа G3 (Таблица 8) включает 5 коротких продуктов длиной от 36 до 42 н, что, в лучшем случае, лишь на 6 н превышает длину праймер-димеров, а продукт Pr-23 длиной 36 н является праймер-димером, встречающимся исключительно в серии F, соответствующей неинкубированному РНК. Продукт Pr-22 встречается в контроле (серия F) чаще, чем в других сериях, поэтому также разумнее всего отнести его к артефактам ПЦР. Несколько больший интерес представляют продукты Pr-21 и Pr-24, примечательные вторичной структурой (Рис. 15Г), сходной с таковой у Pr-1 (Рис. 15А).

3.1.10 Продукты G-4

Эта группа объединяет самые длинные продукты 169-172 н, которые образуются только в присутствии 5'-ppp-M2-РНК (Таблица 8). Таких продуктов выявлено только 4 типа в 8 колониях, причем ни один не встречается в С-серии (5'-ОН-РНК), хотя 3 из них найдены в F-серии (время инкубации 0 ч). Обнаружение этих продуктов подтверждает гипотезу, что 5'-трифосфат, являясь активированной формой фосфата, может предоставлять дополнительный путь рекомбинации наряду с путями, обеспечиваемыми 2',3'-циклофосфатом. Учитывая малое количество выявленных продуктов, этот путь не является предпочтительным для РНК. С другой стороны, большая протяженность и наличие многих «слабых» сайтов этих продуктов может способствовать их быстрому расщеплению.

3.1.11 Продукты G-5

Все остальные продукты, собранные в группу G5, характеризуются, во-первых, редкой встречаемостью, во-вторых, встречаемостью только в одной экспериментальной серии (Таблица 8). В связи с редкостью данных продуктов затруднительно делать какие-либо

однозначные выводы об их появлении. Так, Pr-39, Pr-43 и Pr-50 встречаются только в А-серии (ON+), однако они явно не являются матрично-зависимыми и, возможно, могли бы встретиться в любой другой серии. Продукты Pr-44–Pr-49 детектированы только в F-серии (отрицательный контроль), а отсутствие их в других сериях может быть объяснено только случайностью.

Анализ продуктов G5 программой RNAFold позволил выявить большое разнообразие вторичных структур. В некоторых структурах лигирование происходит в 1- (Pr-40) и 3-н (Pr-50) боковых или внутренних (Pr-35, Pr-37) петлях, в этом отношении они сходны с распространенными продуктами групп G1 и G2. В таких случаях их появление ожидаемо, особенно, если структура сходна со структурой более распространенных продуктов. Однако появление таких продуктов как Pr-38 или Pr-42 (Рис. 15Д) объяснить труднее с точки зрения вторичной структуры. Участники лигирования не сближены, а, наоборот, находятся в разных стеблях. Конечно, сближение может происходить также за счет третичных взаимодействий. Однако стоит указать, что продукты группы G5 представляют значительно меньший интерес по сравнению с продуктами групп G1 и G2, в первую очередь, по причине редкой встречаемости. Даже без учета того, что продукты группы G5 с большей, чем продукты групп G1 и G2, вероятностью могут быть артефактами ОТ-ПЦР, их следует рассматривать как минорные варианты развития процесса рекомбинации РНК. Основной вариант рекомбинации РНК в отсутствие матрицы приводит к формированию продуктов группы G2.

3.1.12 Молекулярное моделирование продуктов группы G2

Целью экспериментов по молекулярному моделированию было выявление молекулярных механизмов неферментативной рекомбинации РНК. В качестве модели был выбран продукт Pr-13 как наиболее часто встречающийся в группе G2. Помимо полноразмерной модели (53 н) было создано несколько укороченных моделей: 38 н, 33 н, 27 н (Рис. 16), различающихся длиной и размером стебля, но не участком лигирования. После симулирования в течение 100 нс, было рассчитано среднеквадратичное отклонение положения атомов для всех нуклеотидов и отдельно для нуклеотидов петли. Была показана высокая стабильность участка концевой петли, тогда как общая структура была значительно более лабильна (Таблица 9, рис. 17А).

Вероятность того, что реакция трансэтерификации произойдет, зависит, в числе прочего, от двух факторов. Первый фактор - расстояние между реагирующими атомами, в данном случае 2',3' Р атом 3'цитидина (HIV-1 РНК) и O5' атом 5'уридина (M2-РНК). Вторым фактором - угол, образованный атомами O5'-P-O2' либо O5'-P-O3'. Чем ближе угол к 180 ° тем больше вероятность, что произойдет реакция лигирования. Следует отметить, что данное правило касается и расщепления РНК по механизму трансэтерификации.

Таблица 9. РНК модели, среднеквадратичное отклонение, средние межатомные расстояния

Модель	RMSD (вся структура)	RMSD (петля)	Среднее межатомное расстояние (d)
53 nt	6.0 Å ± 1.7	2.2 Å ± 0.4	7.4 Å ± 2.6
38 nt	8.5 Å ± 2.0	1.5 Å ± 0.3	9.9 Å ± 5.6
33 nt	5.7 Å ± 1.4	1.5 Å ± 0.3	6.3 Å ± 2.5
27 nt	4.3 Å ± 0.8	1.6 Å ± 0.3	6.5 Å ± 2.3

Среднее расстояние между реагирующими атомами составило от $6.308 \text{ \AA} \pm 2.469$ до $9.930 \text{ \AA} \pm 5.576$ (Таблица 9). Если принять, что дистанция, обеспечивающая возможность лигирования составляет $3\text{-}5 \text{ \AA}$, то в рассмотренных структурах реагирующие атомы в среднем находятся вне дистанции реакции, однако до 10% времени могут находиться внутри этой дистанции (Рис. 17Б).

Мы приняли условно, что для конформации «в линию» угол $5\text{-}O'\text{-}P\text{-}O2'$ или $O5'\text{-}P\text{-}O3'$ принимает значения от 150° до 180° . В случае расщепления реакция протекает однозначно – $2'$ -O атакует атом фосфора, $5'$ -O становится уходящей группой, образуется $2'3'$ -циклофосфат. В случае лигирования атакующей группой является $5'$ -O, а уходящей группой может быть как $2'$ -O, так и $3'$ -O, причем, в первом случае образуется $3'\text{-}5'$ -связь, а во втором $2'\text{-}5'$ -связь. Мы сравнили вероятности образования $3'\text{-}5'$ - (Рис. 18А) и $2'\text{-}5'$ - (Рис. 18Б) связей. Оказалось, что образование $3'\text{-}5'$ -или $2'\text{-}5'$ -связи зависит от РНК-модели. Так, для модели длиной 33 н вероятность образования $2'\text{-}5'$ -связи гораздо выше (99%), чем $3'\text{-}5'$ -связи (1%), тогда как для модели 38 н дело обстоит наоборот (вероятность образования $3'\text{-}5'$ -связи 85%) (Рис. 18). В среднем для четырех моделей наблюдается предпочтительное образование $2'\text{-}5'$ -связи.

Важнейшим критерием достоверности результатов молекулярного моделирования является их сопоставимость с экспериментальными данными. В данном случае первый и самый главный вывод, который можно сделать из результатов молекулярного моделирования, заключается в том, что вероятность образования продукта Pr-13 из фрагментов HIV- и M2-РНК

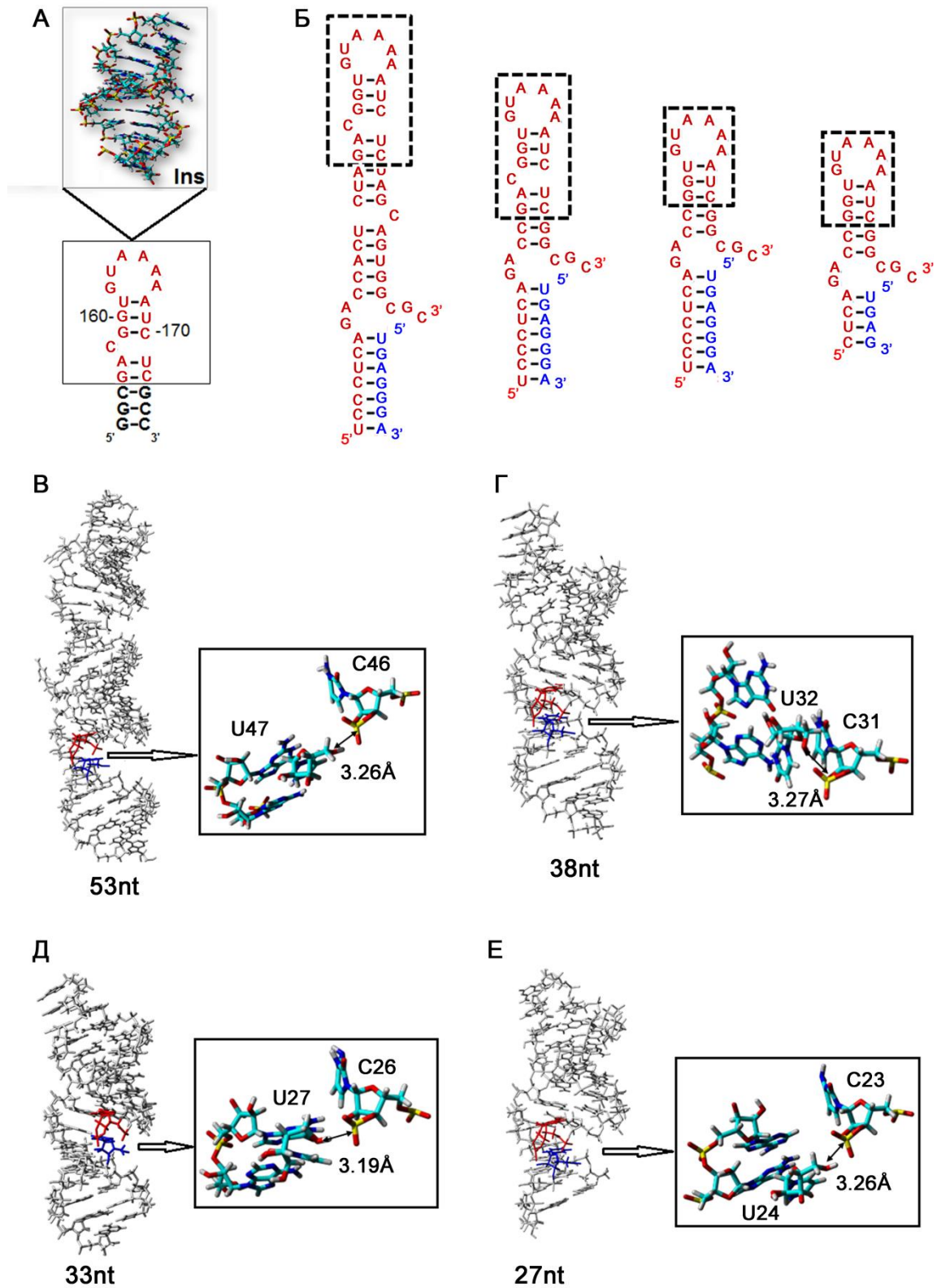


Рис. 16. Вторичные структуры: А. HIV-1 А-богатая петля. Красным показаны нуклеотиды, входящие в HIV, черным – добавленные для моделирования. Б. Модельные РНК структуры, слева направо: 53-, 38-, 33- и 27-звенная. Красным показаны фрагменты HIV-РНК, синим – М2-РНК, соответственно. 3D структуры исследованных РНК-моделей: 53 н (В), 38 н (Г), 33 н (Д) и 27 н (Е). Красным и синим показаны нуклеотиды, участвующие в реакции лигирования: 3'-С HIV-1 РНК и 5'-U М2-RNA, соответственно.

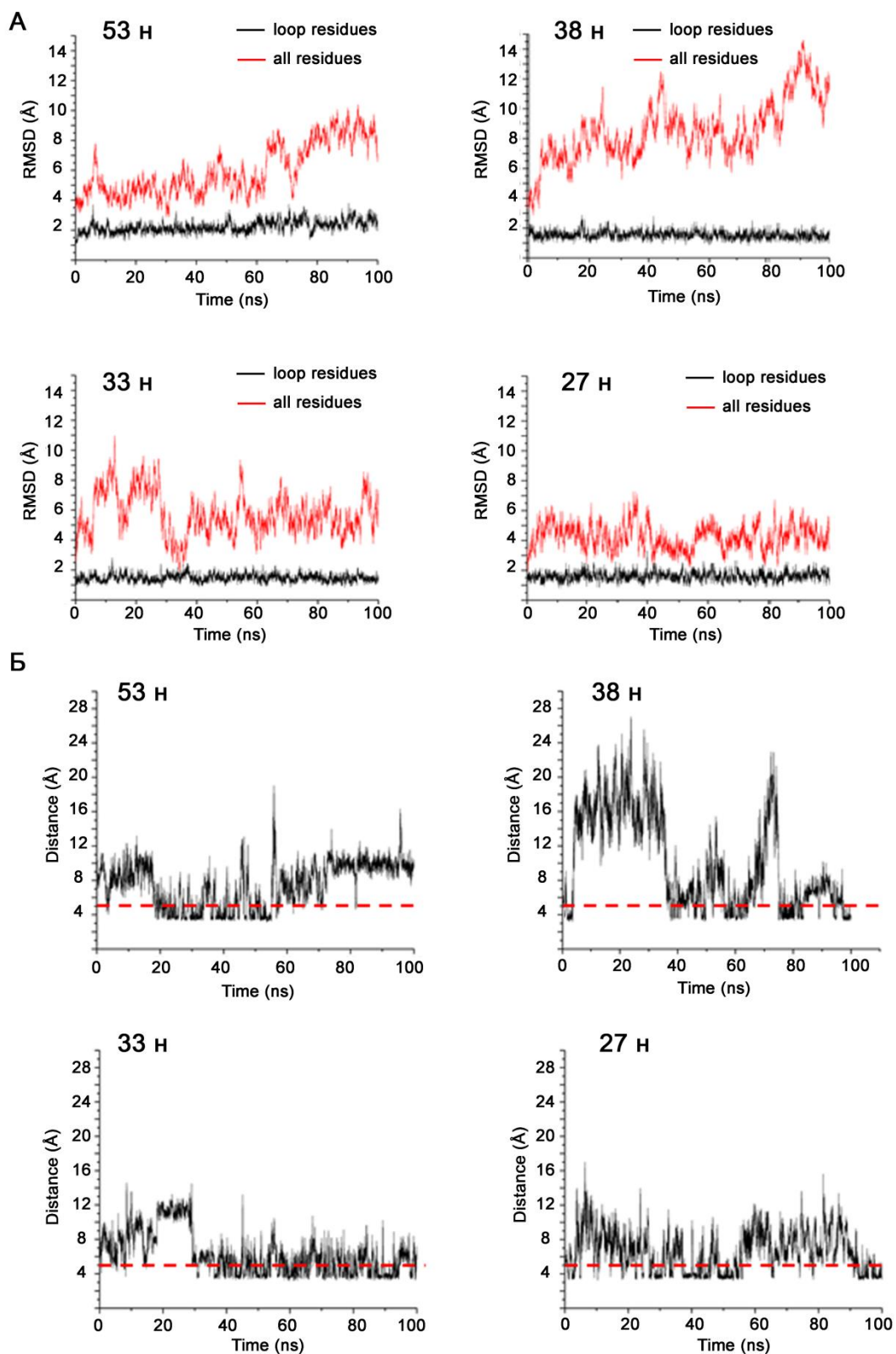


Рис. 17. А. Среднеквадратичное отклонение (RMSd) положения атомов каждой из четырех моделей: 53 н; 38 н; 33 н и 27 н. RMSd атомов, относящихся к петле, показаны черным, всех атомов – красным. Б. Расстояния между атомами, участвующими в реакции лигирования: 2'- или 3'-Р атом 3'цитидина (HIV-1 РНК) и О5' атом 5'уридина (M2-RNA) для каждой из четырех моделей после 100 нс симуляции: 53 н, 38 н, 33 н и 27 н. Красная линия показывает максимальное расстояние, обеспечивающее лигирование.

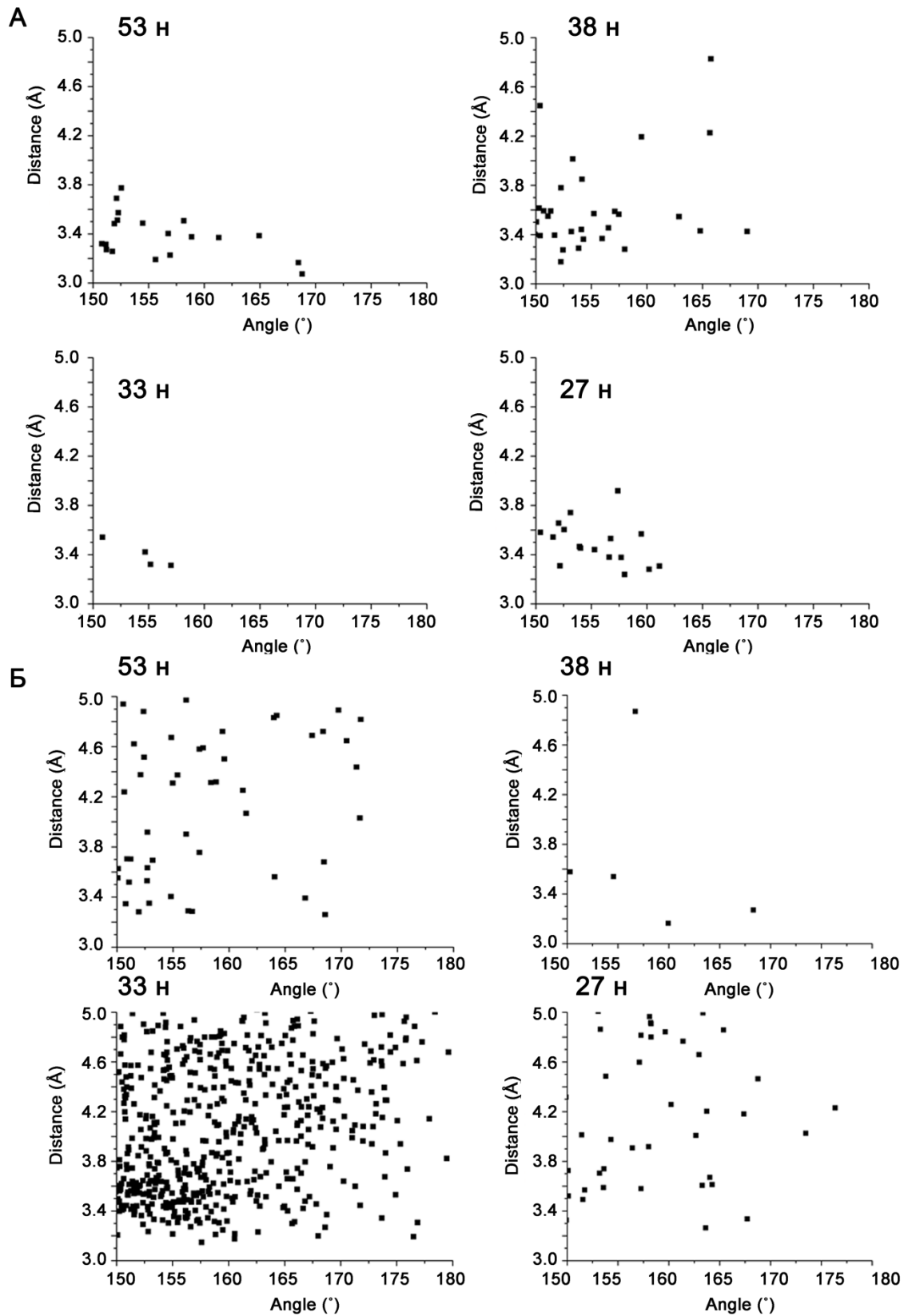


Рис. 18. А. Возможности образования 3',5'-продукта для каждой из четырех моделей после 100 нс симуляции: 53 н, 38 н, 33 н и 27 н. Дистанция между P-O5' и 3-5 Å и угол O5'-P-O2' 150-180°. Б. Возможности образования 2',5'-продукта для каждой из четырех моделей после 100 нс симуляции: 53 н, 38 н, 33 н и 27 н. Дистанция между P-O5' и 3-5 Å и угол O5'-P-O2' 150-180°.

не равна нулю. Второй достоверный вывод заключается в том, что отдаленные участки РНК влияют на протекание реакции расщепления/лигирования по определенному сайту. Это видно из того факта, что во всех четырех моделях участок лигирования идентичен, и различия касаются только смежных участков, отдаленных по крайней мере на две п.н. Что касается различия вероятностей образования 3'-5'-или 2'-5'-связи, то без экспериментального подтверждения эти различия нельзя рассматривать как установленный факт. Тем не менее, эти данные могут считаться основанием для гипотезы о природе формируемой связи.

3.1.12 Паттерн расщепления РНК

С целью выявить связь между образуемыми продуктами и фрагментами первичного расщепления РНК исследовали кинетику расщепления HIV-РНК и M2-РНК в присутствии ионов магния в условиях, воспроизводящих условия реакции рекомбинации, с тем исключением, что HIV-РНК и M2-РНК исследовали отдельно. Обе РНК были мечены 3'-³²P-рСр и инкубированы в присутствии ON-матрицы в течение 0, 2, 5, 24, 48 и 72 ч. Продукты расщепления разделяли в 15% ПААГ (Рис. 19). На основании данных можно сделать несколько интересных выводов, коррелирующих с результатами по секвенированию продуктов рекомбинации.

Во-первых, расщепление по всем сайтам для обеих РНК в присутствии матрицы несколько усиливается. Это говорит о том, матрица, связываясь с РНК, дестабилизирует их и делает более доступными для расщепления. В случае M2-РНК заметнее всего усиливается расщепление по участку 49-55, высвобождаемому при связывании M2-РНК с матрицей. В случае с HIV-РНК матрица связывается с участком 28-40, разрушает домен 24-60, тем самым усиливая расщепление по нему, в результате чего снижается вероятность формирования продуктов G2. Таким образом, подтверждается ранее сделанный нами вывод, что присутствие матрицы препятствует формированию продуктов G2 и сдвигает процесс рекомбинации в сторону формирования продуктов G1.

3.1.13 Лигирование РНК в петлях

В данной работе мы исследовали процесс рекомбинации в модельной системе, включающей два 96-звенных РНК фрагмента и ионы Mg²⁺ в качестве катализатора реакции рекомбинации.

Расположение реагирующих групп в оптимальной конформации зависит от структуры РНК. Мы показали, что реакция трансэтерификации РНК протекает главным образом во внутренних, боковых и концевых петлях. Лигирование РНК в петлях продемонстрировано

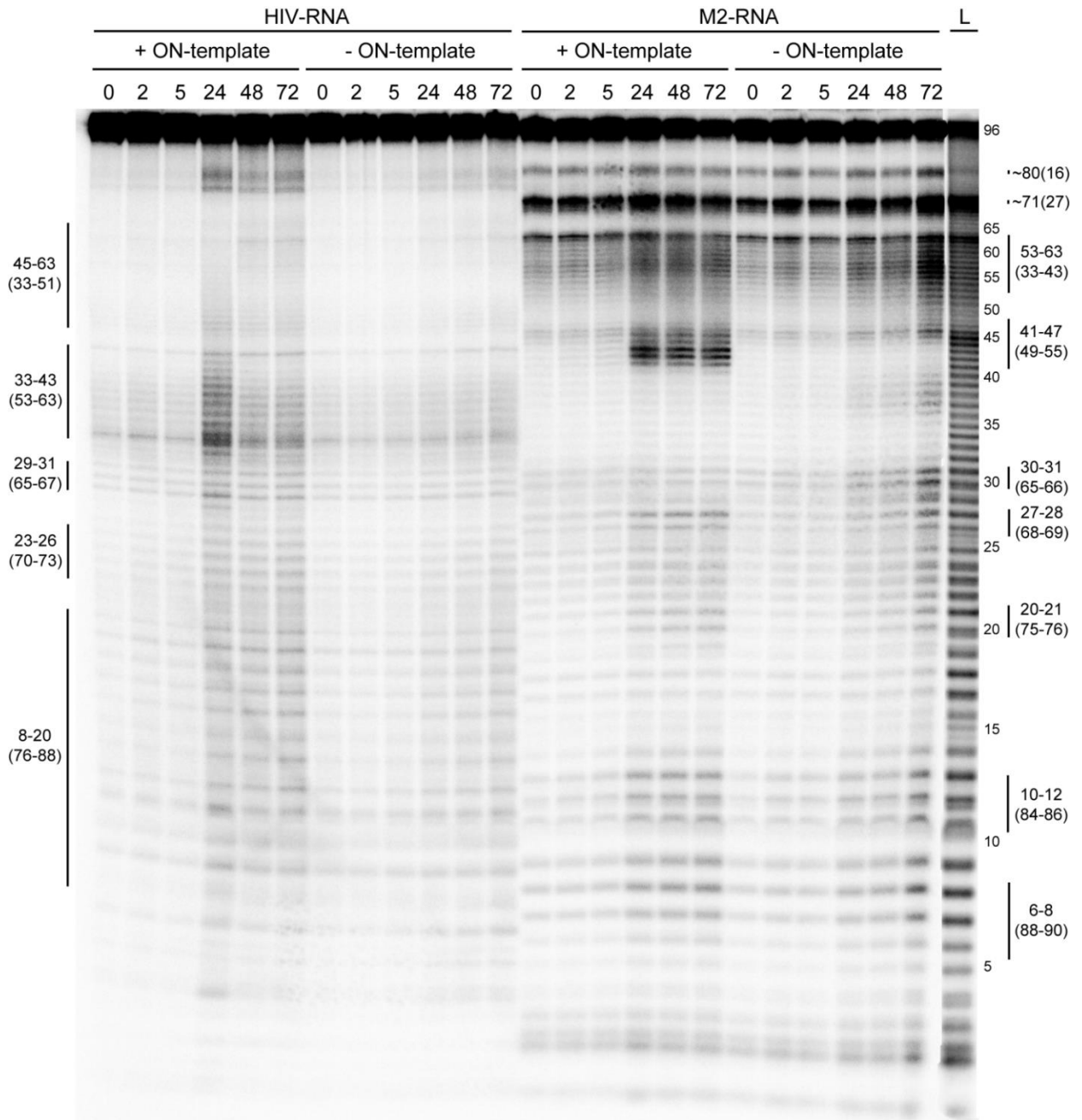


Рис. 19. Паттерн расщепления 3'-³²рСр-меченых HIV-РНК и M2-РНК в присутствии Mg²⁺ в течение 0, 2, 5, 42, 48 и 72 ч в присутствии/отсутствии ON-матрицы. Электрофореграмма разделения продуктов расщепления в 15% ПААГ. L – имидазольный лэддер.

ранее в ряде исследований, причем некоторые результаты хорошо коррелируют с полученными нами данными.

В работе [277] были исследованы особенности протекания реакции автокатализируемого лигирования в петлях, образованных искусственными рибозимами. Лигирование происходило

во внутренней петле, образованной тандемными GA мисматчами, которые чрезвычайно сильно стабилизируют петлю. Было показано, что в петлях данного типа образование 3'-5'-связи происходило в 60 раз быстрее, чем 2'-5'-связи, хотя в свободном состоянии 2'-ОН в 6 раз более активен, чем 3'-ОН. Разная вероятность образования 3'-5' и 2'-5'-связей показана методом молекулярной динамики для несколькими модельных РНК, основанных на продукте Pr-13. Однако без прямого экспериментального подтверждения мы не можем строго утверждать, что в модели 33 н вероятность формирования 2'-5'-связи выше, чем 3'-5'-связи.

Другая особенность лигирования РНК в петлях, касающаяся структуры участка лигирования и подтверждающая наши результаты, была установленная в работах [278,279], где было продемонстрировано лигирование субстратов, один из которых находится в дуплексе, а второй – в свисающем 4-звенном фрагменте. Аналогичная структура продемонстрирована нами на примере продукта Pr-13. В других продуктах группы G2 структура сайта лигирования сходна, хотя количество нуклеотидов в свисающем конце может отличаться.

Лигирование в концевых петлях продемонстрировано в прямых экспериментах [280] с использованием модельной системы, включающей два синтетических 24-звенных рибоолигонуклеотида: G24 и C24. Авторы показали, что при инкубации 5'P-G24-3'ОН и 5'ОН-C24-3'ОН в воде образуются два продукта C24G24 и C24G. Группа 3'ОН C24 производит нуклеофильную атаку на 5'-фосфат G24 (лигирование) либо на межнуклеотидный атом фосфора (рекомбинация). Вторая реакция не идентична реакции рекомбинации, описанной в данной работе, поскольку включает только один акт трансэтерификации, тогда как в нашей модели рекомбинация включает два независимых акта трансэтерификации – расщепление с образованием 2'3'-циклофосфата и последующее лигирование, при котором 2'3'-циклофосфат выступает активированной формой фосфата. Также в работе [6] используется фосфат в неактивированной форме – 5'-фосфат, т.е. реакция не является энергетически нейтральной. Авторы предполагают, что лигирование происходит в 5-н концевой петле, что коррелирует с нашими данными. Однако можно предположить, что лигирование в данной системе может также происходить в 4-хзвенных или меньшего размера петлях. Вопрос о том, какая из групп, 3'-ОН или 2'-ОН, выступает в качестве нуклеофила, не рассматривается, хотя авторы предполагают, что это 3'-ОН, без экспериментальной проверки. Однако, как было ранее показано, этот вопрос не может быть решен однозначно, и в каждой конкретной структуре можно наблюдать определенное соотношение продуктов лигирования с участием 3'-ОН и 2'-ОН.

Таким образом, протекание реакции трансэтерификации РНК в боковых и внутренних петлях, продемонстрированное в настоящей работе, подтверждает литературные данные.

Структура петли, а также близлежащие нуклеотиды и отдаленные элементы структуры оказывают значительное влияние на протекание реакции трансэтерификации, смещая равновесие в сторону расщепления или лигирования, в последнем случае смещая реакцию в сторону формирования 2'-5'- или 3'-5'-связей.

3.1.14 Равновесие между расщеплением и лигированием

Выше мы обсуждали, что реакция рекомбинации в нашей модели разделена на два этапа: расщепление и лигирование. Хотя в химическом смысле эти реакции обратны, и, соответственно, можно ожидать наступления равновесия, вопрос, наступает ли в данной системе равновесие, остается открытым. В используемых РНК много сайтов расщепления и лигирования, и за расщеплением по одному сайту может следовать лигирование по другому сайту. Говоря в общем, продукты лигирования не обязательно совпадают с субстратами расщепления. До тех пор, пока равновесие не наступает, продолжающиеся реакции расщепления/лигирования приводят к обогащению пула РНК новыми молекулами.

Рекомбинация РНК – это динамический процесс, и любой комплементарный комплекс может подвергаться диссоциации, приводящей к тому, что фрагменты РНК образуют другие комплексы. Высвобождение РНК из комплекса с матрицей или другим фрагментом РНК имеет два эффекта. Во-первых, вторичная структура РНК меняется и, соответственно, меняется локализация «слабых сайтов». Во-вторых, одноцепочечные фрагменты значительно более чувствительны к расщепляющим факторам, чем двуцепочечные. Таким образом, выходы рекомбинантных продуктов зависят не только от простоты формирования субстратов лигирования и способности их к комплексообразованию, но и от стабильности двуцепочечных комплексов, сохраняющих субстраты от быстрой деградации. Стабильные комплексы обуславливают формирование групп продуктов G1 и G2 (Таблица 8), выявленных в большом числе колоний. В первом случае в состав комплекса входит матрица, во втором – только фрагменты HIV- и M2-РНК (Рис. 15В). Отдельного упоминания заслуживает комплекс, приводящий к формированию продукта Pr-1 (Рис. 15А,Б). Этот продукт образуется с относительно высоким выходом относительно других продуктов, как в присутствии, так и в отсутствие матрицы. Таким образом, фрагменты, формирующие этот продукт, образуют два типа комплексов, один из которых включает в состав матрицу, второй – нет, но оба комплекса очень стабильны и приводят к формированию одинакового продукта.

Выбранные условия реакции (37 °С, рН 8.0, 72 ч) обеспечивают реакции и лигирования, и расщепления, возможность диссоциации коротких комплексов и сохранность РНК в течение реакции.

3.1.15 Направленная рекомбинация

Несмотря на высокий текущий интерес к рибозима, не так много исследований посвящено свойствам неферментативного лигирования. Вследствие низких выходов реакции описанные в литературе модельные системы обычно ограничены полиN субстратами и матрицами, короткими или химерными олигонуклеотидами, использованием матриц с преформированием дуплексов. Все эти ограничения направлены на образование одного или ограниченного числа продуктов реакции. Однако, рекомбинация может протекать в разных и, что немаловажно, неожиданных направлениях, поэтому ограничения лишают нас информации о возможных направлениях реакции рекомбинации. Если предоставить реакции рекомбинации двигаться в произвольном направлении, можно надеяться выявить ряд неожиданных продуктов. Наша работа представляет собой попытку предоставить реакциям расщепления/лигирования «свободу выбора», заключающуюся в наличии множества возможных вариантов.

Разумеется, следовало ожидать, что реакция не может идти полностью свободно, т.е. с равной вероятностью по каждому нуклеотиду. На спектр образующихся продуктов влияет выбор «строительных блоков», или «модулей» РНК, способных к образованию комплексов за счет протяженных участков комплементарности. Экспериментально показана возможность формирования функционально активных РНК из «блоков»-предшественников в результате самосборки. Например, показана возможность образования функционально активного рибозима (интрона группы I) в процессе неферментативной рекомбинации из четырех олигорибонуклеотидов [281,282].

Выбор строительных блоков, необходимых для создания рекомбинантных продуктов, перечисленных в таблице 6, происходит как на стадии расщепления, так и на стадии лигирования. На стадии расщепления главный критерий отбора модулей - это расположение «слабых» сайтов РНК. Однако, легкость диссоциации РНК-фрагментов из комплексов и конкуренция между фрагментами определяет доступность блоков для реакции лигирования. Так, M2 фрагмент (Рис. 15В) конкурирует с уходящим HIV фрагментом и «побеждает» благодаря формированию более протяженного дуплекса. Если блоки доступны, они могут отбираться снова и снова, при этом преимущества получают те, которые образуют наиболее прочные комплексы благодаря образованию более длинных дуплексов.

Последней стадией отбора является способность фрагментов вступать в реакцию лигирования, обеспечивая размещение реагирующих групп (2',3'-циклофосфат и 5'-ОН) в оптимальной конформации в линию. Успех прохождения РНК-фрагментами всех стадий отбора определяет относительный выход разных продуктов рекомбинации.

По результатам анализа можно выделить три типа комплексов, вносящих решающий вклад в формирование продуктов рекомбинации РНК, включая один матрично-зависимый комплекс (группа продуктов G2) и два матрично-независимых (Pr-1 и группа G2). О том, какое значение играют данные комплексы в процессе рекомбинации, можно судить по количеству соответствующих продуктов. Так, в экспериментальной серии А (5'-ppp+, ON+) из 81 продукта 62 продукта, или 77% соответствовали одному из трех комплексов. Аналогичные значения для серий В (5'-ppp+, ON-) и С (5'-ppp-, ON+) составляют 98 из 134 (73%) и 94 из 106 (89%), соответственно. Таким образом, всего два (в отсутствии матрицы) или три (в присутствии матрицы) комплекса обеспечивают формирование 73-89% всех рекомбинантных продуктов, структурно сходных между собой, тогда как множество нестабильных комплексов приводят к формированию структурно разнообразных продуктов, составляющих в сумме 11-27% всего пула.

3.1.16 Заключение

Была исследована модельная система из двух 96-звенных фрагментов РНК: фрагмент М2 РНК вируса гриппа и фрагмент HIV РНК (здесь и далее М2-РНК и HIV-РНК) в условиях, обеспечивающих возможность протекание реакций трансэтерификации, или сопряженных реакций расщепления/лигирования, катализируемых ионами Mg^{2+} в отсутствие ферментов. 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. Кроме того, найдено несколько продуктов, образовавшихся в результате лигирования в концевой петле.

Реакции трансэтерификации не являются случайными, вторичная и третичная структура РНК направляет их протекание по определенным участкам. При формировании двуцепочечного комплекса, в котором сближены 2',3'-циклофосфат и 5'-ОН, возможна реакция лигирования, и она тем более вероятна, чем прочнее комплекс. Такой комплекс может возникнуть спонтанно и, если может существовать длительное время, привести к образованию серии продуктов. Также можно индуцировать создание такого комплекса комплементарным олигонуклеотидом-матрицей и, таким образом, индуцировать образование определенного типа продуктов.

Установление закономерностей протекания реакции трансэтерификации РНК позволяет предсказать поведение РНК, например, при взаимодействии с РНК-направленными агентами-лекарствами. Это откроет возможность выбирать участки РНК-мишени, наиболее подходящие для связывания и расщепления.

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

3.2.1 Введение

Олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (ОПК) представляют собой иРНКазы сайт-направленного действия, специфичность действия которых обеспечивается РНК-узнающим доменом, а каталитический эффект – РНК-расщепляющий домен. В нашей работе в роли РНК-узнающего домена выступает олигодезоксирибонуклеотид для всех типов ОПК, хотя в этом качестве может быть использован какой-либо другой аналог нуклеиновых кислот. Цель использования аналогов нуклеиновых кислот состоит в увеличении устойчивости иРНКазы к воздействию клеточных нуклеаз. На данном этапе работы мы исследовали ОПК, направленные на модельную РНК, поэтому не было необходимости использовать какие-либо варианты, кроме ДНК. В качестве РНК-расщепляющего домена ОПК содержат пептид. Ранее была показана способность пептидов из чередующихся остатков лейцина и аргинина расщеплять РНК. Несколько вариантов таких пептидов использованы в данной работе.

3.2.2 РНК-субстраты

В качестве модельной РНК для исследования реакции сайт-направленного расщепления РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК) была выбрана фенилаланиновая тРНК (тРНК^{Phe}) дрожжей (Рис. 20А), которую получали с помощью транскрипции *in vitro*. Дрожжевая тРНК^{Phe} не является клинически значимой мишенью для ОПК, однако по ряду причин сравнение рибонуклеазной активности новых ОПК было целесообразно проводить именно на этой мишени. Во-первых, тРНК^{Phe} из дрожжей ранее была использована в ряде исследований, например, для изучения свойств имидазол-содержащих конструкций и имидазол-содержащих олигонуклеотидных конъюгатов [235,250]. Таким образом, исследуемые в данной работе конъюгаты можно напрямую сравнивать с исследованными ранее конструкциями. Во-вторых, тРНК^{Phe} дрожжей содержит структурные элементы (стебли, концевые петли, перекрестки, одноцепочечные участки), характерные для любой природной РНК. Соответственно, данные по расщеплению дрожжевой тРНК^{Phe} позволят с некоторой степенью достоверности предсказать действие изучаемых конъюгатов при адресации к клинически значимым РНК. В третьих, взаимодействие олигонуклеотидов с этой РНК было детально изучено ранее [283]. Кроме того, следует отметить простоту получения транскрипта тРНК^{Phe} из дрожжей *in vitro*, небольшой размер (76 нуклеотидов) и, как следствие, удобство в работе и относительную простоту интерпретации результатов расщепления.

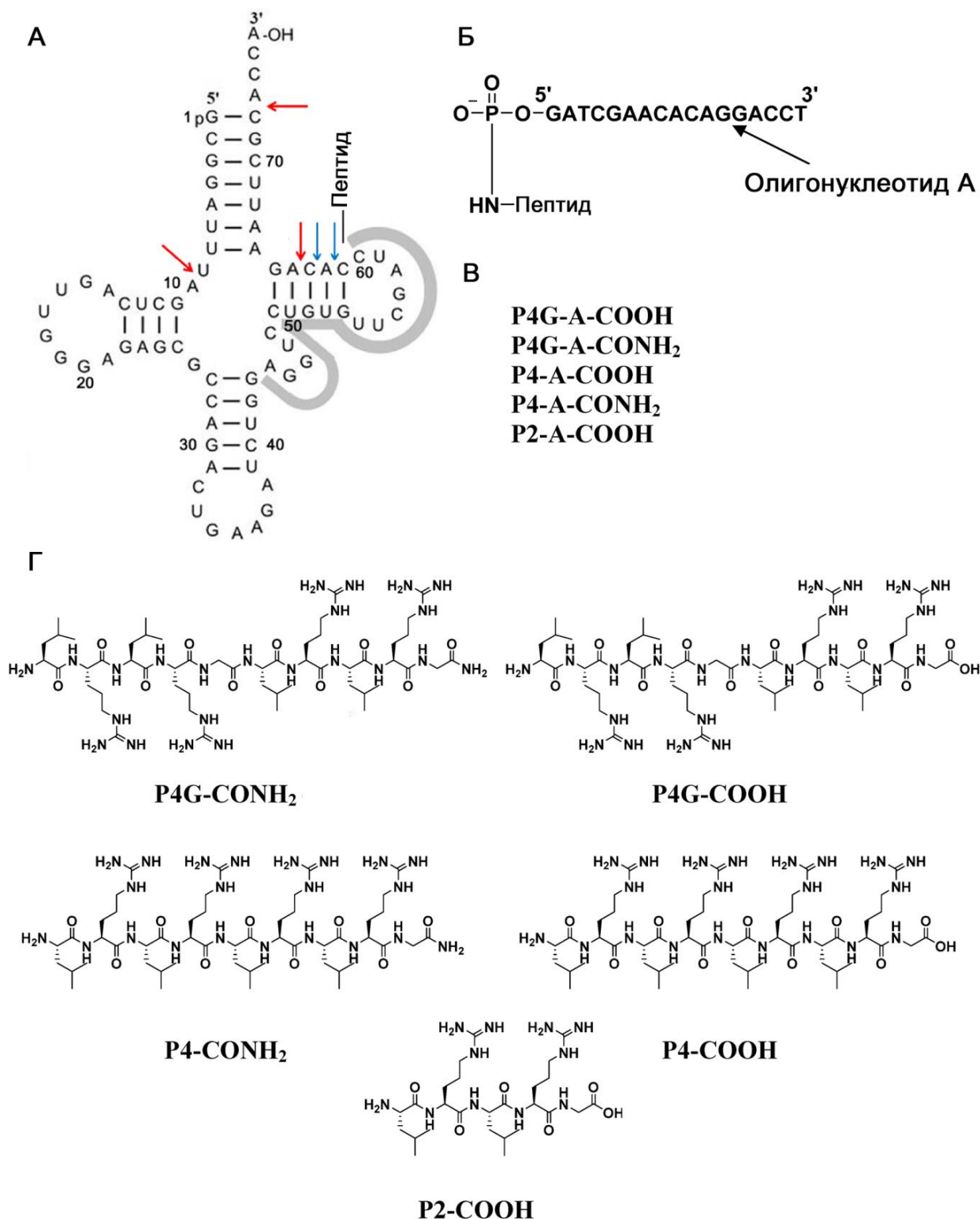


Рис. 20. А. Вторичная структура *in vitro* транскрипта тРНК^{Phe} дрожжей и сайт связывания олигонуклеотида А (5'-GATCGAACACAGGACCT-3', серая линия). Красные и синие стрелки указывают основные и минорные сайты расщепления тРНК^{Phe} линейными ОПК, соответственно. Б. Общая схема строения линейных ОПК. В. Номенклатура линейных ОПК, буквой А обозначен олигонуклеотид, Р2/Р4 – пептид, СООН или СОНН₂ показывают, какая группа находится на С-конце пептида. Г. Структура пептидов, входящих в состав ОПК.

В качестве контроля специфичности расщепления РНК был использован 96-звенный фрагмент HIV-1 РНК, также полученный транскрипцией *in vitro*. Главным критерием выбора этой РНК в качестве контроля специфичности действия ОПК было отсутствие участков, комплементарных олигонуклеотиду А, входящему в состав всех конъюгатов первой серии, вследствие чего не происходит связывания ОПК с HIV-1 РНК и, соответственно, не происходит сайт-направленного расщепления этой РНК.

3.2.3 Линейные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты

3.2.3.1 Дизайн линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов

ОПК первой серии получили название линейных. ОПК этой серии представляет собой олигонуклеотид с присоединенным к его 5'-концевому фосфату каталитическим пептидом (Рис. 20Б). Первая серия ОПК состояла из пяти конъюгатов, содержащих одинаковый РНК-связывающий домен и отличающихся только каталитическим доменом. В качестве узнающего домена использован 17-звенный олигонуклеотид, комплементарный вариательной и ТΨС-петлям (участку 44-60) дрожжевой тРНК^{Phe}. Таким образом, при образовании комплекса конъюгат:тРНК^{Phe} пептид располагается в непосредственной близости от участка 61-САСАG-65 (Рис. 20А, Б), который и является мишенью для расщепления, тогда как в свободной тРНК^{Phe} участок 61-САСАG-65 находится в составе ТΨС-стебля и недоступен для расщепления. Олигонуклеотид, связываясь с тРНК^{Phe}, разворачивает ТΨС-шпильку и делает участок 61-САСАG-65 доступным для расщепления. Примечательно, что связывание тРНК^{Phe} с олигонуклеотидом А приводит к разворачиванию ТΨС-петли, но, предположительно, не влияет на структуру остальной части молекулы тРНК^{Phe}. Выбор последовательности олигонуклеотида и, соответственно, целевого участка расщепления обусловлен двумя причинами. Во-первых, последовательность САСАG содержит две СА-связи, которые высокочувствительны к расщеплению различными агентами [284]. Во-вторых, ранее описанные имидазол-содержащие иРНКазы также были направлены к этому участку тРНК^{Phe}.

В качестве каталитического домена ОПК было выбрано несколько пептидов, состоящих из чередующихся остатков лейцина и аргинина, а также включающих остаток глицина (Рис. 20В, Г). Ранее [254,255] было показано, что пептид (LeuArg)₄Gly-NH₂ способен катализировать расщепление фосфодиэфирных связей в РНК в случае его присоединения к олигонуклеотиду; при этом олигонуклеотид не комплементарен расщепляемой РНК-мишени. Пептиды, входящие в состав линейных ОПК, отличались количеством повторяющихся аминокислотных пар лейцин-аргинин (LRLRG, LRLRLRLRG, P2 и P4, соответственно). Кроме того, два пептида содержали в центре остаток глицина (LRLRGLRLRG, P4G), который должен увеличить

конформационную подвижность всей каталитической конструкции. Выбор глицина не случаен: известно, что глицин играет ключевую роль в увеличении конформационной подвижности активных центров многих ферментов, что обеспечивает эффективное связывание субстрата и его расщепление [285–288]. Активные центры многих ферментов обогащены мотивами G-X-Y или Y-X-G, где X и Y – это полярные и неполярные аминокислоты [285], подобных мотиву LRG в пептидах, используемых в ОПК. Наконец, пептиды P4 и P4G были использованы в двух вариантах: с карбоксильной и амидной группой на С-конце (Рис. 20Г P4G-COОН, P4G-CONH₂, P4-COОН и P4 -CONH₂).

3.2.3.2 Связывание линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с тРНК^{Phe}

Способность конъюгатов связываться с тРНК^{Phe} исследовали методом задержки в геле. Меченую флуоресцеинизотиоцианатом по 3'-концу тРНК^{Phe} (здесь и далее 3'-FITC-тРНК^{Phe}) в концентрации 0.5 μМ инкубировали в течение 30 мин в реакционном буфере Т (50 мМ Трис-НСl, рН 7.0; 0.2 М КСl, 1 мМ ЭДТА) в присутствии конъюгата в концентрации от 0.5 μМ до 10 μМ. Далее реакцию смесь анализировали в 10% нативном ПААГ. Комплекс ОПК:3'-FITC-тРНК^{Phe} обладает значительно меньшей подвижностью в геле по сравнению со свободной 3'-FITC-тРНК^{Phe} (Рис. 21А). Как видно из представленных данных (Рис. 21А, Б), связывание 3'-FITC-тРНК^{Phe} с конъюгатами, имеющими одинаковый РНК-связывающий домен, слабо зависит от структуры каталитического пептида. Как было показано ранее [283], олигонуклеотид А, входящий в состав ОПК, эффективно связывается с тРНК^{Phe} ($K_a = (7.0 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [283]. Равновесные константы ассоциации для всех конъюгатов лежат в микромолярном диапазоне. Линейные ОПК связываются с тРНК^{Phe} несколько менее эффективно, чем олигонуклеотид А: связывание ОПК с тРНК^{Phe} характеризуется константами в 4-14 раз ниже, чем для олигонуклеотида А (Таблица 10). При этом P2-A-COОН, содержащий самый короткий пептид, лучше всех конъюгатов связывается с тРНК^{Phe}. Конъюгат P4G-A-COОН связывается с мишенью в два раза эффективней, чем P4-A-COОН, хотя различия между K_a находятся в пределах ошибки измерения.

Полное связывание тРНК^{Phe} с конъюгатами наблюдается при концентрации конъюгата в 3-7 раз превышающей концентрацию тРНК^{Phe} (0.5 μМ). Значения K_a для связывания конъюгатов, несущих карбоксильную или амидную группу на С-конце пептида, достоверно не различаются.

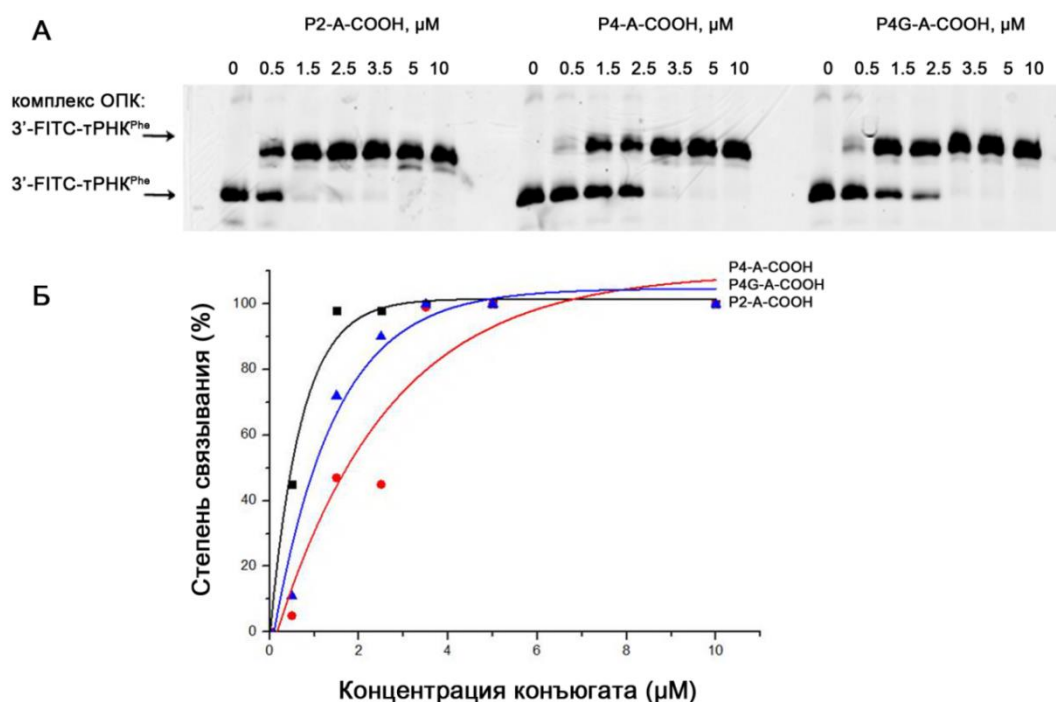


Рис. 21. Анализ связывания линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с 3'-FITC-тРНК^{Phe} (0.5 μM) методом задержки в геле. **А.** Электрофореграмма нативного 12% ПААГ, показывающая связывание конъюгатов с 3'-FITC-тРНК^{Phe}. Название и концентрация конъюгата указаны сверху. Стрелки показывают положение в геле 3'-FITC-тРНК^{Phe} и комплекса 3'-FITC-тРНК^{Phe}:конъюгат. **Б.** Концентрационные зависимости связывания конъюгатов P4-A-COOH, P4G-A-COOH и P2-A-COOH с 3'-FITC-тРНК^{Phe}.

Таблица 10. Линейные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты: константы связывания и степень расщепления тРНК^{Phe}.

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

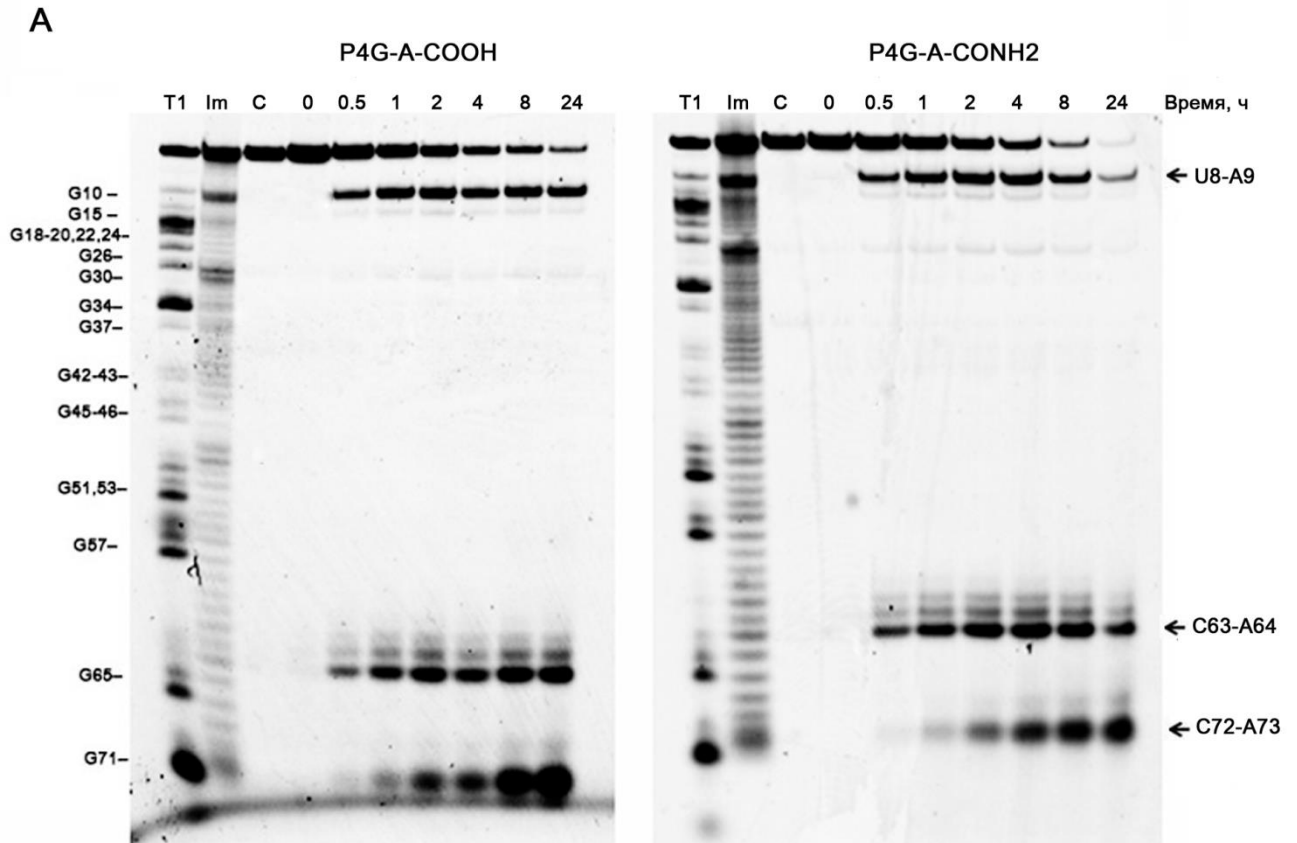
¹⁾ K_a была рассчитана по уравнению $K_a = \alpha / [DC](1 - \alpha)$, где α - степень связывания, [DC] - концентрация конъюгата

²⁾ [тРНК^{Phe}]=1 μM, [conjugate]=20 μM, 37°C, pH=7.0, 24 ч

3.2.3.3 Расщепление тРНК^{Phe} линейными ОПК

Расщепление тРНК^{Phe} линейными конъюгатами проводили в условиях, близких физиологическим (37°C, 50 мМ Трис-НСl, рН 7.0; 0.2 М КСl, 1 мМ EDTA). Буфер на основе трис(оксиметил)аминометана удобен для исследования реакции расщепления РНК, поскольку трис(оксиметил)аминометан не влияет на реакцию трансэтерификации [270]. Присутствие 1 мМ EDTA требуется, чтобы предотвратить нежелательное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} следовыми количествами ионов двухвалентных металлов. После инкубации с ОПК продукты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} разделяли в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Для идентификации сайтов расщепления использовали лэддеры, полученные путем частичного гидролиза 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере. На рис. 22 приведены примеры расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами Р4G-А-СООН и Р4G-А-CONH₂, а также кинетики расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} всеми исследованными ОПК. Не наблюдалось спонтанного расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} в отсутствие ОПК в условиях реакции при инкубации в течение 24 ч. Кроме того, не происходило расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} в присутствии свободных олигонуклеотида А и пептида Р4G. Таким образом, можно заключить, что пептиды, использованные в работе, проявляют рибонуклеазную активность только после присоединения к олигонуклеотиду в составе конъюгата, что согласуется с данными, полученными ранее [255].

Как видно из представленных электрофореграмм (Рис. 22А), расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} линейными конъюгатами происходит по участку С61-G65, а основным сайтом расщепления является фосфодиэфирная связь С63-А64, более слабое расщепление наблюдается по связям С61-А62 и А62-С63, также расположенным в целевом участке. Соотношение продуктов расщепления по указанным сайтам определяется, по-видимому, их стерической доступностью для пептида и чувствительностью к расщеплению. Кроме расщепления по целевому участку С61-G65, расщеплению подвергались две связи, расположенные на достаточно большом расстоянии от этого участка: U8-А9 и С72-А73, степень расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} по этим связям была близка к таковой для связи С63-А64 и составляла от 20 до 40%. тРНК^{Phe} образует третичную структуру, в которой сайты U8-А9 и С72-А73 сближены с 61-САСАG-65 (подробное обсуждение приведено ниже). При формировании комплекса с конъюгатом третичная структура тРНК^{Phe} частично нарушается и становится более гибкой. Согласно нашим оценочным расчетам, даже в жесткой ненарушенной структуре тРНК^{Phe} пептид в составе конъюгата способен дотянуться до связей U8-А9 и С72-А73.



Б

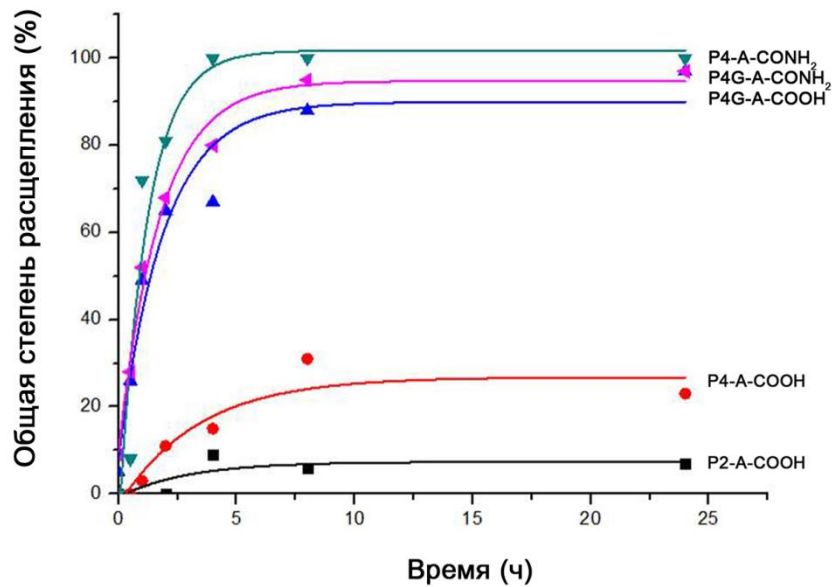


Рис. 22. Расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} линейными олигонуклеотид-пептидными конъюгатами. **А.** Электрофореграмма денатурирующего 12% ПААГ, показывающая расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами P4G-A-COOH и P4G-A-CONH₂. Название конъюгата и время инкубации указаны сверху. T1 и Im, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. С, 3'-FITC-тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие конъюгатов в течение 24 ч. Сайты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Кинетика расщепления тРНК^{Phe} линейными олигонуклеотид-пептидными конъюгатами.

Следует отметить, что в радиус действия пептида попадает значительная часть тРНК^{Phe}, однако расщеплению вне целевого участка подвергаются только связи U8-A9 и C72-A73, наиболее чувствительные к действию РНКаз [289]. Этот факт подтверждает, что при проектировании любых РНК-расщепляющих агентов сайт-направленного действия требуется проводить предварительный поиск чувствительных к расщеплению сайтов с учетом вторичной и третичной структур РНК.

3.2.3.4 Кинетика расщепления тРНК^{Phe} линейными олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Кинетика реакции расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} была исследована для всех конъюгатов первой серии в условиях однооборотной реакции (1 μ М 3'-FITC-тРНК^{Phe}, 20 μ М конъюгат) (Рис. 22Б). Наименьшая скорость расщепления РНК наблюдалась для ОПК P2-A-COOH, для которого общая степень расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} составила 7% за 24 ч (Таблица 10, Рис. 22Б). Основным сайтом расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} этим конъюгатом является связь U8-A9, незначительное (< 1%) расщепление наблюдалось также по сайту C63-A64, тогда как расщепление по сайту C72-A73, характерное для других конъюгатов серии, полностью отсутствовало. Это может быть объяснено удаленностью сайта C72-A73 от точки присоединения пептида, кроме того, пептид P2 самый короткий среди пептидов, использованных в данной серии, и, по-видимому, не достает до связи C72-A73.

Умеренная скорость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} наблюдалась для ОПК P4-A-COOH (общая степень расщепления тРНК^{Phe} 24% за 24 ч), причем кривая расщепления выходит на плато уже через 8 ч (Таблица 10, Рис. 22Б). P4-A-COOH расщепляет тРНК^{Phe} по трем сайтам: U8-A9 > C63-A64 \geq C72-A73. Следует отметить, что, как и в случае с P2-A-COOH основным сайтом расщепления является связь U8-A9 (15%), которая находится вне целевого участка C61-G65.

Остальные конъюгаты этой серии - P4G-A-COOH, P4-A-CONH₂ и P4G-A-CONH₂ - эффективно расщепляли 3'-FITC-тРНК^{Phe}. Для этих конъюгатов наблюдалось количественное (90-100%) расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} за 4 (P4-A-CONH₂) и 8 (P4G-A-CONH₂) ч, (Таблица 10, Рис. 22Б). Такой уровень расщепления значительно превышает значения, полученные для сходного ОПК *per-1a*, направленного к тРНК^{Lys} [290]. Конъюгат *per-1a* расщеплял тРНК^{Lys} на 55% за 24 ч при соотношении *per-1a*: тРНК^{Lys} 100:1 (концентрация тРНК^{Lys} 1 μ М).

Конъюгаты P4-A-CONH₂ и P4G-A-CONH₂, так же как и P4G-A-COOH, расщепляют тРНК^{Phe} по трем основным сайтам: это связи U8-A9, C63-A64 и C72-A73, а также по связям C61-A62 и A62-C63 в целевом участке. Продукт U8-A9 (фрагмент тРНК^{Phe} 5'-A9-A76-3',

образующийся вследствие расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} по связи U8-A9, здесь и далее продукт U8-A9; аналогично для других продуктов расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe}) появляется одновременно с продуктом С63-А64, в заметном количестве присутствует в реакционной смеси уже через 0.5 ч инкубации. Через 1 ч количество продукта U8-A9 максимально, после чего его количество либо остается на одном уровне (P4G-A-COOH), либо снижается до нуля (P4-A-CONH₂ и P4G-A-CONH₂), что является следствием его расщепления по другим связям. Связь U8-A9 пространственно сближена с пептидом в третичной структуре тРНК^{Phe} (Рис. 23) и одновременно эта связь является чувствительной к расщеплению различными агентами [270,291]. Следует отметить, что после расщепления по связи U8-A9 конъюгат остается связанным с фрагментом А9-А76 и расщепление тРНК^{Phe} происходит уже по другим связям.

Расщеплению по целевому участку соответствуют продукты С63-А64, С61-А62 и А62-С63, которые образуются одновременно с продуктом U8-A9, количество этих продуктов постепенно увеличивается к 4-8 ч и далее остается неизменным. Продукт С72-А73 появляется позже других; через 1 ч инкубации с конъюгатом этот продукт наблюдается лишь в следовых количествах, затем его количество постепенно увеличивается и достигает максимума к 24 ч. На основании полученных данных можно заключить, что продукт С72-А73 является результатом вторичного расщепления, т.е. расщепления продуктов С63-А64, С61-А62 и А62-С63 по связи С72-А73. Напротив, расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} по связям С63-А64, С61-А62 и А62-С63 и U8-A9 является первичным, хотя нельзя исключить некоторого вклада вторичного расщепления в образование этих продуктов.

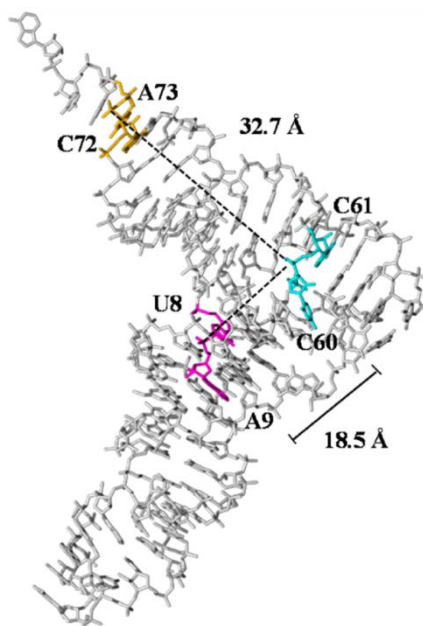


Рис. 23. Кристаллическая структура тРНК^{Phe}. Пунктирными линиями обозначены расстояния между точкой присоединения пептида (С60-С61, голубой) и расщепляемыми связями U8 -А9 (фиолетовый) и С72 -А73 (желтый).

3.2.3.5 Концентрационная зависимость расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COОН

На рис. 24 представлена концентрационная зависимость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COОН. График зависимости имеет вид кривой с насыщением, причем кривая выходит на плато при концентрации конъюгата 10-20 мМ. Согласно нашим данным, при концентрации конъюгата P4G-A-COОН 5 мМ 100% 3'-FITC-тРНК^{Phe} находится в комплексе с конъюгатом (Рис. 21). Интересно отметить, что уже после достижения плато, при повышении концентрации конъюгата P4G-A-COОН от 10 до 40 мМ, хотя и не наблюдается повышения общей степени расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe}, наблюдается изменения соотношения продуктов расщепления по сайтам U8-A9 и C72-A73. Этот факт может быть объяснен расщеплением образующихся фрагментов U8-A9 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COОН по связи C72-A73. Такой механизм означает, что фрагмент 3'-FITC-тРНК^{Phe} A9-A76, образовавшийся после расщепления по сайту, диссоциирует из комплекса с конъюгатом, а затем при высоких концентрациях ОПК вновь связывается с ним и подвергается дальнейшему расщеплению по связи C72-A73. Нельзя исключить, что конъюгат не всегда принимает активную конформацию при связывании с тРНК^{Phe}, и увеличение концентрации конъюгата повышает вероятность связывания с тРНК именно ОПК в активной конформации. Примечательно, что никакие другие связи в тРНК расщеплению не подвергаются даже при очень больших избытках ОПК по отношению в тРНК^{Phe}.

Требуется объяснения тот факт, что концентрационная зависимость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} с конъюгатом P4G-A-COОН «запаздывает» за кривой связывания 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом. Логичным было бы предположить, что если при концентрации P4G-A-COОН 5 мМ 100% 3'-FITC-тРНК^{Phe} связано в комплекс, то при тех же 5 мМ кривая расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} будет выходить на плато, однако, в действительности максимум расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} достигается только при более чем вдвое большей концентрации P4G-A-COОН. При концентрации P4G-A-COОН 5 мМ степень расщепления составляет только около 50%, тогда как при концентрации конъюгата P4G-A-COОН 20 мМ степень расщепления тРНК составляет 97%. Одно из возможных объяснений – конъюгат при связывании с мишенью не всегда образует активную конформацию, обеспечивающую расщепление. Поскольку между свободным конъюгатом и конъюгатом, связанным с 3'-FITC-тРНК^{Phe}, существует равновесие, при высокой концентрации конъюгата рано или поздно происходит связывание с РНК конъюгата в активной конформации, что и приводит к расщеплению 3'-FITC-тРНК^{Phe}.

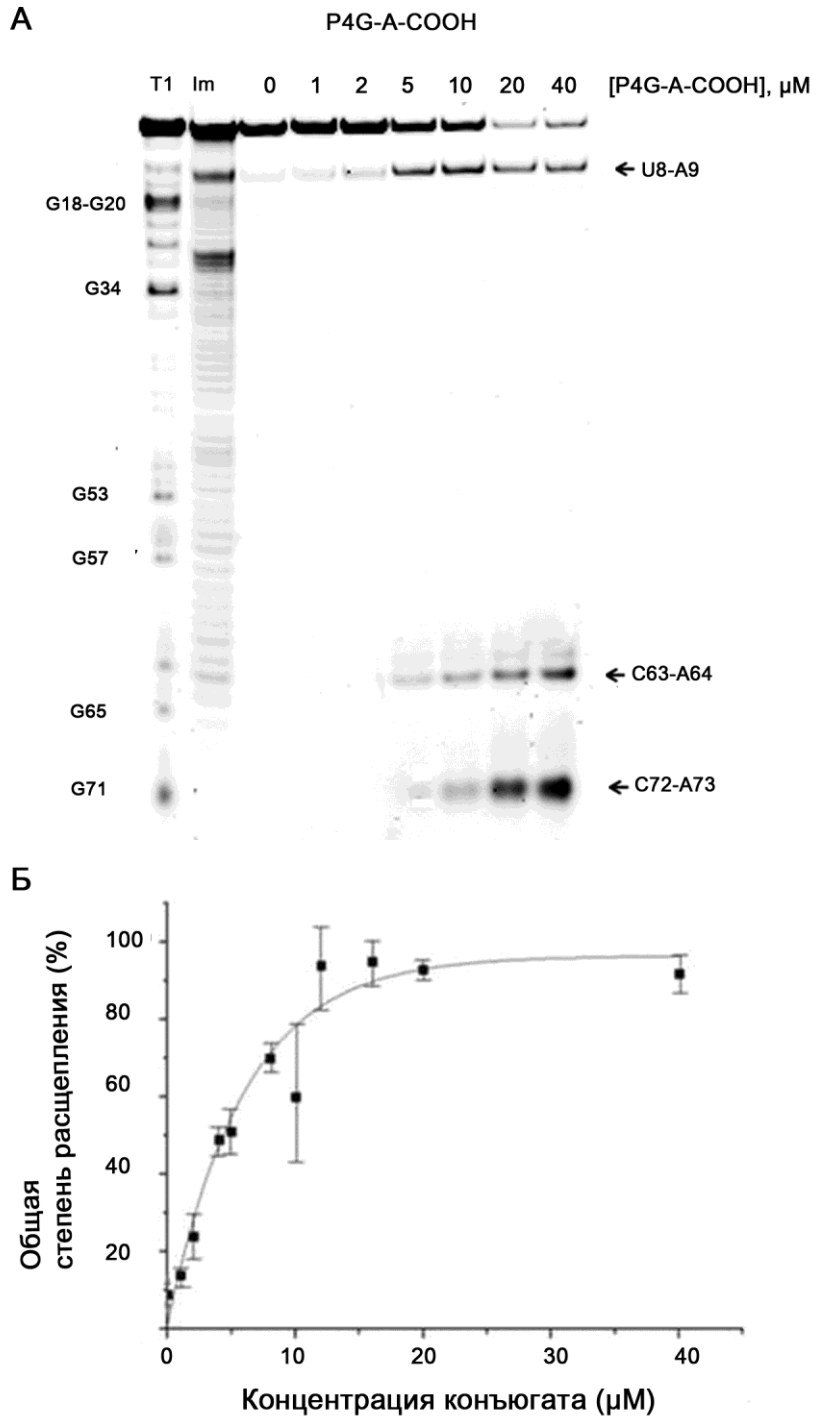


Рис. 24. Концентрационная зависимость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COOH. **A.** Разделение продуктов расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} (1 μM) в 12% денатурирующем ПААГ после инкубации при 37°C в течение 24 ч в присутствии конъюгата P4G-A-COOH. Сверху указаны концентрации P4G-A-COOH (μM). Дорожки T1 и Im, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. Сайты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и конъюгатом P4G-A-COOH указаны слева и справа, соответственно. **Б.** Концентрационная зависимость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом P4G-A-COOH.

3.2.3.6 Оценка радиуса действия линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в составе комплекса с тРНК^{Phe}

Появление дополнительных сайтов расщепления помимо целевого сайта можно объяснить наличием сложной третичной структуры тРНК^{Phe}, в которой D- и ТΨС-петли сближены за счет комплементарных взаимодействий между G18-Ψ55 (в случае транскрипта место псевдоуридина Ψ занимает уридин U) и G19-C56 [292]. Чтобы оценить, способен ли пептид в составе конъюгата дотянуться до расщепляемых связей, была использована программа YASARA NOVA [293]. С ее помощью были оценены длины пептидов, входящих в состав всех исследованных конъюгатов, которые составили 18.2 Å для P2, 32.8 Å для P4 и 36.5 Å для P4G. Эти длины можно рассматривать как верхнюю границу радиуса действия пептида, поскольку пептид в растворе может принимать любые конформации. Вторым оцененным нами параметром – расстояние между атомами фосфора связи C60-C61 и расщепляемых связей U8-A9, C63-A64 и C72-A73 в кристаллической структуре тРНК^{Phe} [292]. Связь C60-C61 находится в непосредственной близости от точки присоединения пептида к олигонуклеотиду в ОПК. Таким образом, измеренное нами расстояние позволяет оценить с некоторой погрешностью, какая длина пептида будет достаточной для расщепления по рассматриваемым связям. Следует признать, что это достаточно грубая оценка, однако мы ограничились ею ввиду того, что построить методами молекулярного моделирования систему, включающую тРНК^{Phe} в комплексе с конъюгатом, представляет очень трудоемкую задачу.

Расстояние до связи U8-A9 составило 18.5 Å, таким образом, эта связь находится в полной досягаемости для пептидов P4 и P4G и почти на границе досягаемости пептида P2, что хорошо коррелирует с данными о расщеплении тРНК^{Phe} по этой связи. Другой сайт расщепления (C72-A73) находится значительно дальше от C60-C61 – на расстоянии 32.7 Å. Таким образом, эта связь оказывается внутри радиуса действия пептидов P4G и P4 (36.5 Å и 32.8 Å, соответственно), однако далеко за пределами радиуса действия P2. Еще один источник погрешности в рассмотренных измерениях – нарушение L-структуры тРНК^{Phe} при образовании комплекса тРНК^{Phe}:конъюгат, в результате чего подвижность структуры и доступность отдаленных связей повышается. В присутствии ионов магния, стабилизирующих структуру РНК, наблюдается значительное снижение эффективности расщепления тРНК^{Phe} ОПК (первичные данные не приведены), что свидетельствует о чрезвычайной важности подвижности структуры мишени для ее расщепления. Этот момент требуется учитывать при создании конъюгатов, направленных против биологически значимых РНК и действующих внутри клетки.

3.2.3.7 Влияние структуры линейных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на эффективность расщепления тРНК^{Phe}

Конъюгат P2-A-COON, содержащий 5-звенный пептид в качестве каталитического домена, не проявляет рибонуклеазной активности, в отличие от других ОПК, содержащих более длинные 9-10-звенные пептиды. Из полученных нами результатов можно сделать вывод, что изменения в структуре ОПК, например, введение в структуру пептида дополнительного остатка глицина, приводят к значительному изменению их каталитической активности. Сравнивая структуру каталитически активных ОПК, можно выделить два структурных элемента, оказывающих критическое влияние на рибонуклеазную активность ОПК. Первый элемент – это остаток глицина, расположенный в центре пептида между двумя (LR)₂ мотивами. Содержащие остаток глицина пептиды P4G-COON и P4G-CONH₂ в составе линейных ОПК расщепляют 95-100% тРНК^{Phe} в течение 24 ч по сравнению с 24% тРНК^{Phe}, расщепленной конъюгатом, содержащим пептид P4-COON. Вторым элементом – это карбамидная группа на С-конце пептида, введение которой позволяет повысить степень расщепления тРНК^{Phe} с 24% (P4-A-COON) до 100% (P4-A-CONH₂). В случае пептида P4G замена карбоксильной группы на карбамидную не приводит к увеличению ни степени расщепления тРНК^{Phe}, ни скорости расщепления. Вероятно, пептид P4G представляет собой одну из оптимальных каталитических групп в составе ОПК для расщепления РНК, поэтому дополнительная замена COOH-группы на CONH₂-группу не усиливает его активность.

Механизм расщепления фосфодиэфирной связи коротким пептидом, содержащим чередующиеся остатки лейцина и аргинина, строго не доказан, однако можно предположить, что гуанидиновые группы аргинина играют роль кислотно-основного катализатора [294]. Подобно остаткам гистидина в РНКазе А, один из них служит акцептором протона, повышая нуклеофильность кислорода в 2'-положении, а второй – донором протона, улучшая свойства уходящей группы в 5'-положении [295]. Таким образом, в расщеплении 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами принимает участие как минимум два остатка аргинина. Роль других аминокислотных остатков строго не установлена. Остатки лейцина обеспечивают требуемую ориентацию боковых групп аргинина. Функция глицина, введение которого повышает активность конъюгата, заключается в повышении конформационной подвижности пептида, облегчая принятие им требуемой для расщепления конформации. Положительный эффект амидной группы конъюгата P4-A-CONH₂ связан с тем, что эта группа также может либо служить донором/акцептором протона, либо стабилизировать переходное состояние за счет образования водородной связи с одним из несвязывающих атомов кислорода.

Таким образом, на основании исследования серии из пяти ОПК (P4G-A-COON, P2-A-COON, P4-A-COON, P4-A-CONH₂, и P4G-A-CONH₂), адресованных участку С61-G65 тРНК^{Phe}, содержащих одинаковый РНК-узнающий домен - 17-звенный олигонуклеотид А – и различные каталитические домены, было показано, что структура пептида и его длина являются определяющими рибонуклеазную активность ОПК. Особенно важную роль для активности ОПК играет встроенный в середину пептида глицин, обеспечивающий высокую конформационную подвижность пептида и, как следствие, его высокую рибонуклеазную активность. Неожиданно большой вклад в эффективность расщепления вносит также замена карбоксильной концевой группы пептида на карбамидную, которая, по всей видимости, способна принимать непосредственное участие в катализе реакции трансэтерификации. Что касается специфичности расщепления, то вне целевого участка линейные ОПК расщепляют Руг-Х связи, тогда как по целевому участку способны расщеплять также А-С связь.

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

3.2.4.1 Дизайн конъюгатов

Основная идея, лежащая в основе дизайна конъюгатов второй серии, или «двойных» конъюгатов (DC) заключается в создании условий расщепления РНК-мишени в каталитическом режиме, а именно - условий для быстрой диссоциации дуплекса РНК:конъюгат после расщепления. Для этого каталитический пептид был помещен между двух достаточно коротких олигонуклеотидов, комплементарных РНК-мишени таким образом, что при их связывании с РНК между олигонуклеотидами образуется короткий одноцепочечный участок, локализованный напротив пептида. Предполагалось, что после расщепления по этому участку DC будет диссоциировать из менее стабильного комплекса с продуктами расщепления и связываться с новой молекулой РНК. Возможным преимуществом такого дизайна являлось обеспечение каталитического, или многооборотного режима реакции, при котором одна молекула конъюгата действовала бы как катализатор, расщепляя несколько молекул РНК-мишени.

На Рис. 25 представлена общая структура олигонуклеотид-пептидных конъюгатов серии два - «двойных» конъюгатов (double conjugates, DC), направленных к участку 61-CACAG-65 дрожжевой тРНК^{Phe}. Двойные конъюгаты состоят из каталитического пептида, фланкированного двумя РНК-узнающими доменами – олигонуклеотидами. С-конец пептида присоединен к олигонуклеотиду через аминокислотный линкер, N-конец присоединен ко второму олигонуклеотиду либо путем образования фосфамидной связи, либо через N-малеоил-

β -аланиновый и тиогексильный линкеры (здесь и далее малеимидный линкер). Уникальность двойных конъюгатов по сравнению с другими типами ОПК в том, что пептид в структуре конъюгатов выполняет одновременно функции каталитического домена и линкера между двумя РНК-узнающими доменами. Всего было синтезировано, охарактеризовано и изучены свойства 11 DC (Таблицы 11 и 12), отличающихся длиной и структурой пептида, РНК-узнающих олигонуклеотидов и линкеров.

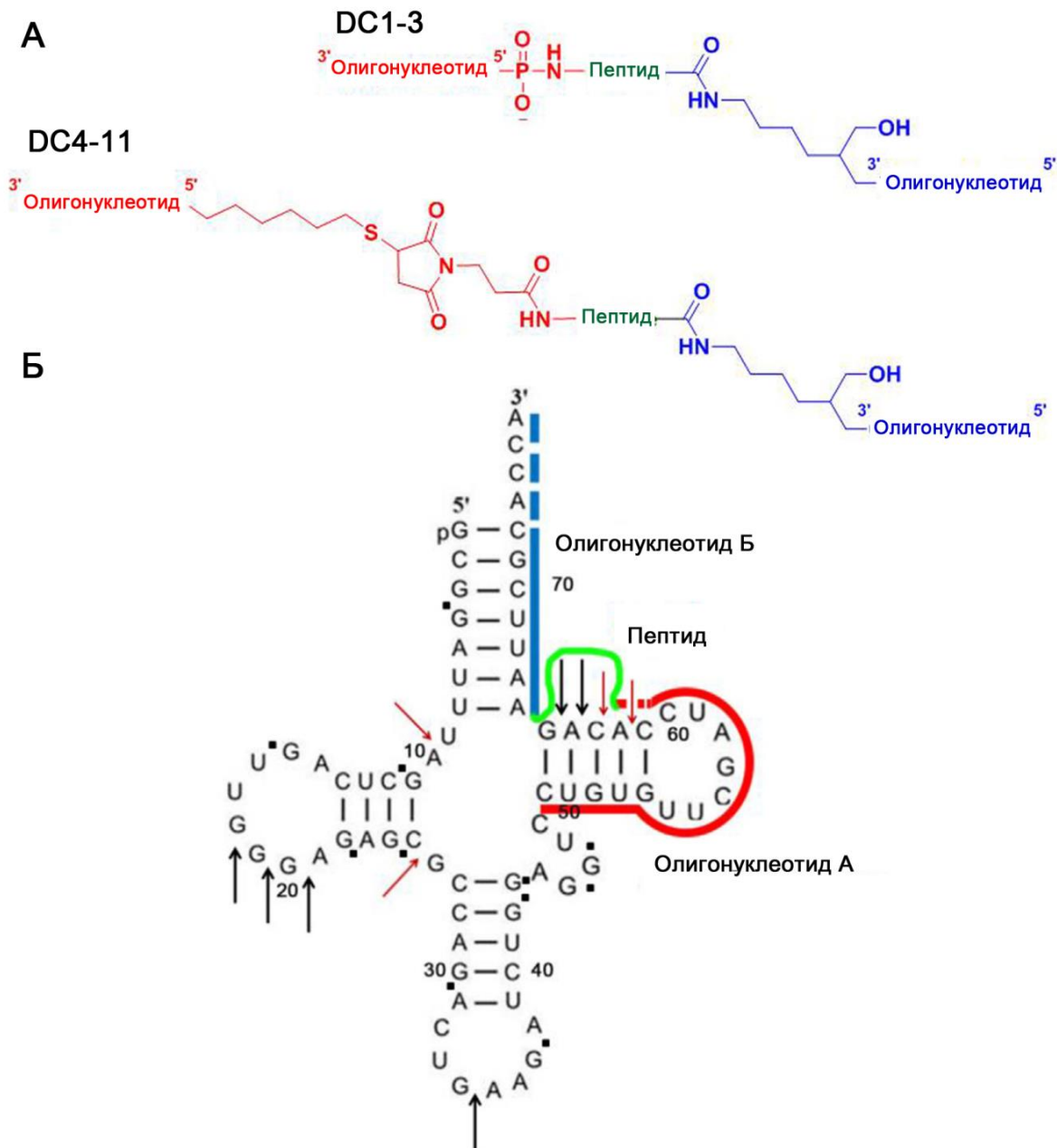


Рис. 25. А. Общая структура «двойных» конъюгатов DC1-3 и DC4-11, показывающая структуру линкеров, пептид (зеленый) и фланкирующие его адресующие олигонуклеотиды. Б. Схема взаимодействия «двойных» конъюгатов с тРНК^{Phe} (транскрипт). Стрелками показаны основные сайты расщепления тРНК^{Phe} конъюгатами DC6 и DC7, точками – минорные сайты. Узнающие домены конъюгатов – олигонуклеотиды А и Б показаны красным и синим, соответственно; пептид обозначен зеленым. Черные стрелки и точки указывают сайты расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом DC6, красные стрелки – DC7.

Таблица 11. Последовательность, участок связывания тРНК^{Phe} и номенклатура РНК-узнающих доменов.

Узнающий домен	Олигону клеотид	Последовательность 5'→3'	Длина, н	Сайт связывания
<u>А</u>	<u>1</u>	GATCGAACACAG ¹⁾	12	49-60
<u>А</u>	<u>2</u>	GATCGAACACAG ²⁾	12	49-60
<u>А</u>	<u>3</u>	GGATCGAACACAG ²⁾	13	49-61
<u>А</u>	<u>4</u>	GTGATCGAACACAG ²⁾	14	49-62
<u>Б</u>	<u>5</u>	TGGTGCGAATT	11	66-76
<u>Б</u>	<u>6</u>	<i>СТААСТ</i> ³⁾	6	66-71
<u>Б</u>	<u>7</u>	CGAATT	6	66-71
<u>Б</u>	<u>8</u>	TGGTGCTAАСТ ³⁾	11	66-76
<u>Б</u>	<u>9</u>	TGGTGCGGGTT ³⁾	11	66-76

¹⁾ Без модификаций на 5'-конце

²⁾ Несет тиогексильный радикал на 5'-конце

³⁾ Содержит мисматчи, выделенные курсивом

Таблица 12. Двойные конъюгаты (DC): номенклатура, состав, константы ассоциации (K_a) и общая степень расщепления тРНК^{Phe} в стандартных условиях.

Конъюгат	Пептид	Узнающий домен А	Узнающий домен Б	$K_a, 10^6 \text{ M}^{-1}$ ¹⁾	Степень расщепления, % ³⁾
DC1	[LR] ₂ G	<u>1</u>	<u>5</u>	0.95±1.1	0
DC2	[LR] ₃ G	<u>1</u>	<u>5</u>	0.91±0.9	0
DC3	[LR] ₄ G	<u>1</u>	<u>5</u>	0.57±0.4	0
DC4	Mal-[LRLRG] ₂	<u>4</u>	<u>5</u>	1.61±0.2	0
DC5	Mal-[LRLRG] ₂	<u>3</u>	<u>5</u>	1.36±0.2	0
DC6	Mal-[LRLRG] ₂	<u>2</u>	<u>5</u>	0.68±0.1	100
DC7	Mal-[LR] ₄ G	<u>2</u>	<u>5</u>	0.55±0.1	50
DC8	[LRLRG] ₂	<u>2</u>	<u>6</u>	Не определена ²⁾	0
DC9	Mal-[LRLRG] ₂	<u>2</u>	<u>7</u>	Не определена	0
DC10	Mal-[LRLRG] ₂	<u>2</u>	<u>8</u>	Не определена	0
DC11	Mal-[LRLRG] ₂	<u>2</u>	<u>9</u>	Не определена	0

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

²⁾ Степень связывания $\alpha \leq 10\%$; оценочное значение K_a не более чем $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$

³⁾ [тРНК^{Phe}]=1 μM , [DCn]=20 μM , 37°C, pH=7.0, 24 ч

Олигонуклеотиды, используемые в качестве узнающих доменов, комплементарны ТҮС-петле и аминокцепторному стеблю тРНК^{Phe} (узнающие домены А и Б, соответственно, Таблица 11). Олигонуклеотиды домена А были выбраны так, чтобы обеспечивать формирование одноцепочечного участка РНК-мишени длиной 5, 4 или 3 нуклеотида (олигонуклеотиды **2, 3, 4**, соответственно). Олигонуклеотиды домена Б были выбраны в соответствии с необходимостью проверить гипотезу о том, что слабое связывание конъюгата с мишенью может обеспечить каталитический режим расщепления. Таким образом, кроме основного олигонуклеотида **5**, были использованы более короткие (**6, 7**) и/или содержащие мисматчи олигонуклеотиды (**6, 8, 9**, Таблица 11).

Длина РНК-узнающих доменов конъюгатов составляет 11-14 н (домен А) и 6-11 н (домен Б) (Таблица 11). Длина каждого из узнающих доменов по отдельности недостаточна, чтобы в условиях реакции (37°C) развернуть термодинамически стабильную структуру тРНК^{Phe} и образовывать с ней прочный комплекс. Однако, соединенные пептидом в составе конъюгата, олигонуклеотиды А и Б, предположительно, могут обеспечить прочное связывание конъюгата с тРНК^{Phe}. Узнающие мотивы были выбраны таким образом, чтобы при образовании комплекса DC:тРНК^{Phe} в структуре тРНК^{Phe} сформировался одноцепочечный участок: 61-CACAG-65, 62-ACAG-65 или 63-CAG-65. Мы предполагали, что формирование одноцепочечного участка напротив пептида обеспечит условия для эффективного расщепления РНК по этому участку.

В качестве каталитического домена использовали пептиды [LR]₂G, [LR]₃G, [LR]₄G (конъюгаты DC1-DC3, соответственно), а также пептиды с малеимидным линкером: Mal-[LR]₄G и Mal-[LRLRG]₂ (конъюгаты DC4-DC11, рис. 6, таблица 3). Пептид Mal-[LRLRG]₂, содержащий в центре остаток глицина, как было показано для линейных конъюгатов, обладал повышенной конформационной подвижностью и эффективно расщеплял РНК. С целью повышения конформационной подвижности всего каталитического домена были использованы подвижные линкеры Mal (N-малеоил-β-аланин и тиогексильная группы).

3.2.4.2 Связывание двойных конъюгатов с 3'-FITC-тРНК^{Phe}

Образование комплекса конъюгат:тРНК^{Phe} предшествует расщеплению тРНК^{Phe} конъюгатом и является необходимым условием расщепления. Способность конъюгатов связываться с тРНК^{Phe} была проанализирована методом задержки в геле (Рис. 26, Таблица 12).

Двойные конъюгаты делятся на две группы в соответствии с их способностью связываться тРНК^{Phe}. Первая группа объединяет конъюгаты DC1-DC7, которые эффективно связываются с тРНК^{Phe}. График зависимости степени связывания от концентрации конъюгата имеет вид кривой с насыщением, которая выходит на плато (близко к 100% связанной тРНК^{Phe})

при концентрации конъюгата около 2.5-5 μM (Рис. 26). Как и следовало ожидать, наибольшее сродство к tRNA^{Phe} проявил конъюгат DC4 ($K_a = 1.6 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, Таблица 12), в состав которого входит самый длинный узнающий домен А (14 нуклеотидов). Конъюгаты с более короткими олигонуклеотидами – DC5 (13 нуклеотидов) и DC6 (12 нуклеотидов) – проявили такое же или чуть меньшее сродство к tRNA^{Phe} ($K_a = 1.4 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $K_a = 0.7 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, соответственно).

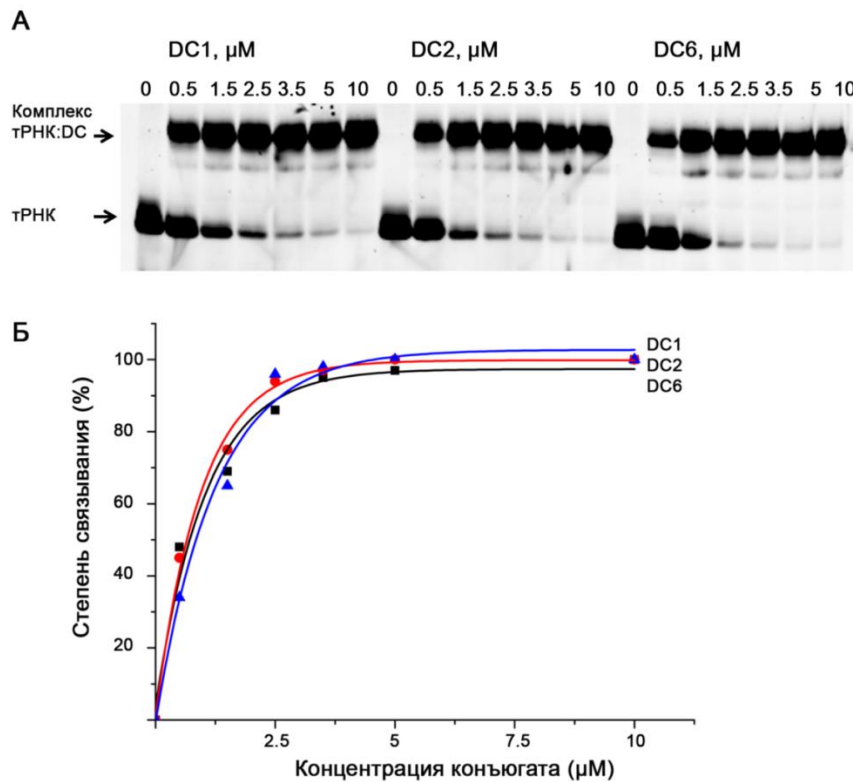


Рис. 26. Связывание конъюгатов DC1, DC2 и DC6 с $3'$ -FITC- tRNA^{Phe} (0.5 μM). **А.** Электрофореграммы нативного 12% ПААГ, показывающие связывание конъюгатов с $3'$ -FITC- tRNA^{Phe} . Тип конъюгата и его концентрация указаны сверху. Стрелки показывают положение в геле свободной $3'$ -FITC- tRNA^{Phe} и комплекса $3'$ -FITC- tRNA^{Phe} :конъюгат. **Б.** Концентрационная зависимость связывания конъюгатов DC1, DC2 и DC6 с $3'$ -FITC- tRNA^{Phe} .

Конъюгаты первой группы DC1, DC2, DC3, DC6 и DC7 включали одни и те же олигонуклеотиды доменов А и Б и отличались длиной и последовательностью пептидов, а также структурой линкеров. Значения констант связывания для этих конъюгатов очень близки, хотя и наблюдается тенденция к снижению с увеличением длины пептида (Таблица 12). Таким образом, длина и последовательность пептида не оказывает значительного влияния на связывание конъюгата с tRNA^{Phe} . Кроме того, следует отметить, что конъюгаты DC3 и DC7 различаются только структурой линкера, и их связывание с tRNA^{Phe} характеризуется одинаковыми K_a (в пределах погрешности измерения).

Ко второй группе относятся конъюгаты DC8, DC9, DC10 и 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 нерасщепленной тРНК^{Phe} и высвобождения конъюгата из комплекса после расщепления. В действительности эти конъюгаты очень слабо связываются с тРНК^{Phe}, степень связывания не превышает 10%. Таким образом, оказалось, что укорочение олигонуклеотидов в домене Б или внесение в их последовательность мисматчей значительно ухудшает гибридизационные свойства таких конъюгатов и препятствует их связыванию с РНК-мишенью.

3.2.4.3 Расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} двойными конъюгатами

Расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} под действием двойных конъюгатов DC1-11 исследовали при физиологическом pH 7.0 и температуре 37°C; 3'-FITC-HIV-РНК, не содержащего участков комплементарности узнающим доменам А и Б, использовали в качестве контроля специфичности действия конъюгатов. Продукты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} анализировали в денатурирующем 12% ПААГ и идентифицировали путем сравнения с продуктами частичного гидролиза 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере (Рис. 27, 28).

Конъюгаты DC1, DC2 и DC3 не расщепляли 3'-FITC-тРНК^{Phe} во всем диапазоне исследованных условий (концентрация конъюгата от 1 до 40 мМ, время до 72 ч, 37°C). Анализ рибонуклеазной активности конъюгатов DC4-DC11 показал, что только DC6 и DC7 эффективно расщепляют 3'-FITC-тРНК^{Phe} (Таблица 12, Рис. 27). Из приведенных данных видно (Рис. 27), что расщепление тРНК^{Phe} под действием DC6 происходит очень быстро по сравнению с другими ОПК: $\tau_{1/2} \approx 1$ ч, а реакция выходит на плато (100% расщепленной РНК-мишени) уже к 4 ч. Конъюгат DC7 расщепляет тРНК со значительно меньшей скоростью, а плато не достигается и через 24 ч инкубации в присутствии конъюгата. Важно отметить, что помимо скорости расщепления DC6 и DC7 различаются и специфичностью расщепления РНК-мишени. Расщепление под действием DC6 происходит исключительно по связям в G-X мотивах (G20-, G34-, G42-, G45-, G65-A66), тогда как для конъюгата DC7 характерна Pур-Х специфичность расщепления: это связи U8-A9 \approx C25-G26 \approx C63-A64. Другими словами, и DC6, и DC7 расщепляют РНК-мишень как вблизи участка связывания (связи G65-A66 и C63-A64, соответственно), так и по связям, сближенным с участками связывания в пространстве (G20-, G34-, G42-, G45- и U8-A9, C25-G26, соответственно). Отсутствует расщепление по связям G51, G53 и G57, локализованным в участке тРНК^{Phe}, образующим дуплекс с олигонуклеотидом А конъюгата DC6. Кинетика расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} самым активным конъюгатом DC6 была исследована в диапазонах 0-24 и 0-72 ч (Рис. 27 и 28, соответственно).

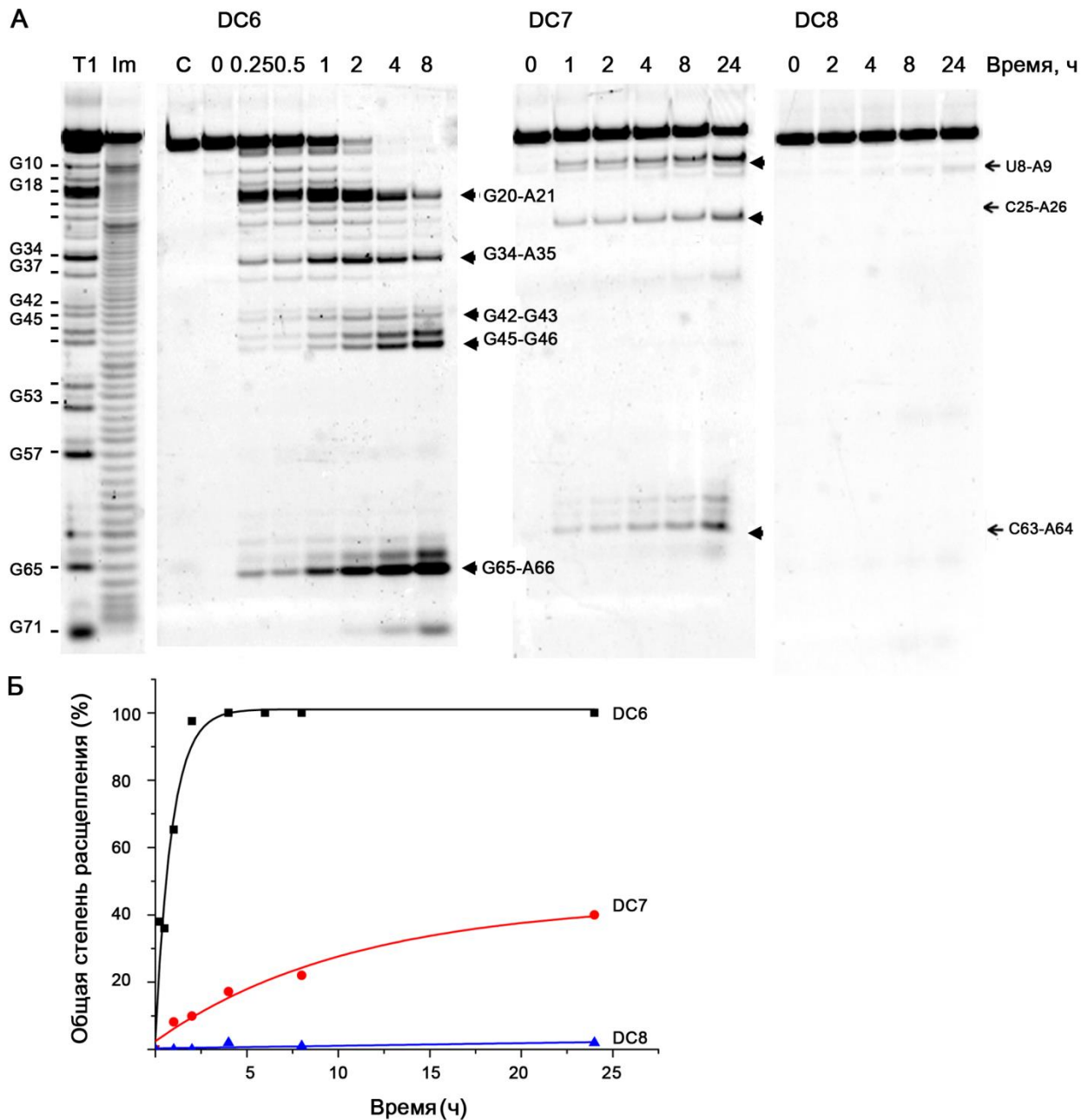


Рис. 27. Расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами DC6, DC7 и DC8. **А.** Разделение продуктов расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} (1 μ M) конъюгатами DC6 (20 μ M), DC7 (20 μ M) и DC8 (20 μ M) в денатурирующем 12% ПААГ. T1 и Im, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. С, 3'-FITC-тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие конъюгатов в течение 24 ч. Сайты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Кинетические кривые расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами DC6, DC7 и DC8.

Из приведенных данных видно, что через 4 ч инкубации 3'-FITC-тРНК^{Phe} в присутствии DC6 наблюдается полное исчезновение интактной 3'-FITC-тРНК^{Phe} из реакционной смеси, при этом в смеси присутствует ряд продуктов (G20-G46), исчезающие при дальнейшей инкубации. Через 24 ч инкубации в смеси присутствует только три коротких продукта (Рис. 28А), и дальнейшая

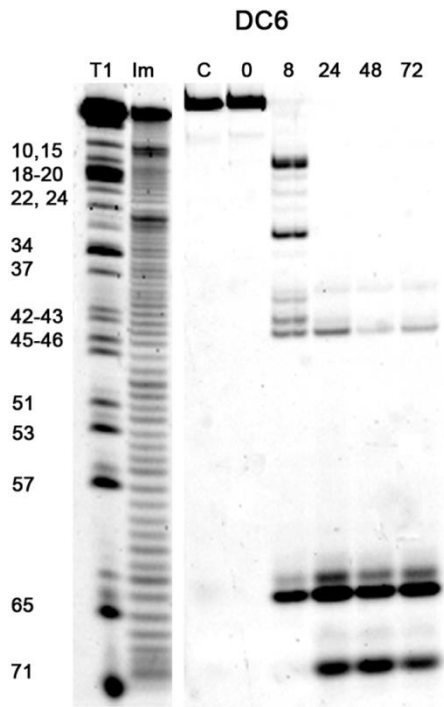


Рис. 28. Расщепление тРНК конъюгатом DC6 в условиях однооборотной реакции. T1 и Im, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. C, 3'-FITC-тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие конъюгатов в течение 72 ч. Сайты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно.

инкубация в течение еще 48 ч не приводит к расщеплению этих продуктов реакции: это фрагмент, соответствующий расщеплению по связям G46, A64, G65 и G71. Среди других конъюгатов в качестве примера можно привести DC8, который практически не расщепляет тРНК: менее 1% за 24 ч.

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

Одна из возможных причин отсутствия рибонуклеазной активности конъюгатов DC1-DC3 заключается в том, что один из олигонуклеотидов (узнающий домен А) присоединен к пептиду через фосфамидную связь, т.е. через линкер нулевой длины. Такой же линкер был использован при создании линейных конъюгатов, проявивших довольно высокую рибонуклеазную активность, поэтому представлялось обоснованным использовать его и при создании двойных ОПК. На основании полученных данных можно предположить, что фосфамидный линкер в составе двойных ОПК настолько ограничивает конформационную подвижность пептида, что делает расщепление фосфодиэфирных связей в РНК невозможным. Вероятно, пептиду, ограниченному в составе двойного ОПК с двух концов, требуется большая степень свободы, чем в составе линейного ОПК, в котором с одного конца ограничений нет.

Конъюгаты DC4-DC11 принципиально отличаются от конъюгатов DC1-DC3 строением каталитического домена, так как в их состав был включен протяженный малеимидный линкер, соединяющий 5'-конец олигонуклеотида А с пептидом (Рис. 6А). Способность ОПК DC6 и DC7 расщеплять РНК-мишень, вероятно, связана с повышением конформационной подвижности пептида, обеспеченной за счет дополнительных протяженных линкеров. Таким образом, наличие длинного гибкого линкера в составе ОПК является необходимым условием, обеспечивающим его активность.

Другим важнейшим фактором, определяющим рибонуклеазную активность ОПК, является структура пептида. Конъюгаты DC6 и DC7 отличаются только наличием в пептиде DC6 дополнительного глицина. Добавление глицина в структуру пептида приводит к кардинальному изменению не только степени и скорости расщепления тРНК^{Phe}, но и к изменению специфичности расщепления. В этом отношении двойные конъюгаты сходны с линейными ОПК.

Хотя из всей серии двойных конъюгатов только два показали высокую степень расщепления тРНК^{Phe}, отсутствие расщепления дает не менее ценную информацию о том, каким образом следует проектировать каталитически активный ОПК. Так, конъюгаты DC4 и DC5 имели более длинный узнающий олигонуклеотид А (по сравнению с DC1-DC3 и с DC6-DC11), а конъюгаты DC8-DC11 – более короткий узнающий олигонуклеотид Б (Таблица 12). Кроме того, ОПК DC8, DC10 и DC11 в составе узнающего олигонуклеотида Б несли мисматчи. Удлинение олигонуклеотида А, входящего в состав конъюгатов DC4 и DC5 на 2 или 1 нуклеотид, соответственно, приводило к соответствующему уменьшению расстояния между олигонуклеотидами А и Б, т.е. сформированного одноцепочечного участка РНК. Изменение пула доступных конформаций пептида приводило, по-видимому, к исключению из него каталитически активных конформаций, в результате чего наблюдалась полная потеря конъюгатами каталитической активности.

Предоставление каталитическому домену полной свободы, однако, необязательно приводит к повышению активности. Конъюгаты DC8-DC11 продемонстрировали очень слабое, на грани детекции (меньше 1%) расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} за 24 ч (Рис. 27). Нужно учесть, что эти ОПК характеризовались слабым сродством к РНК-мишени и не более 10% тРНК^{Phe} находилось в комплексе тРНК^{Phe}:конъюгат при 20-кратном избытке конъюгата, тогда как образование комплекса является необходимым условием расщепления РНК-мишени. Для образования прочного комплекса с тРНК от олигонуклеотида требуется прочное связывание, прежде всего, с АСС-стеблем [283], соответственно, укороченные и/или содержащие мисматчи

олигонуклеотиды 6, 7, 8 и 9 (Таблица 2) не могут обеспечить эффективную гибридизацию с тРНК^{Phe}.

Таким образом, сравнение структура – рибонуклеазная активность конъюгатов серии DC позволяет заключить, что при создании ОПК требуется соблюдать баланс между конформационной подвижностью каталитического домена и гибридизационными свойствами олигонуклеотидов, входящих в ОПК. Предсказать рибонуклеазную активность конъюгата по имеющимся на сегодняшний день данным затруднительно, поэтому единственной возможностью получения эффективных катализаторов расщепления РНК является создание серии конъюгатов с систематически изменяющимися параметрами структуры.

3.2.4.5 Специфичность расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами DC6 и DC7

Конъюгат DC7 расщепляет 3'-FITC-тРНК^{Phe} как по целевому участку 61-CACAG-65 по связям C61-A62, A62-C63 и C63-A64, так и вне его по связям U8-A9 и C25-G26. Продукты расщепления по связям U8-A9 и C25-G26 появляются в реакционной смеси через 1 ч, по связям C61-A62, A62-C63 и C63-A64 – через 4 ч (Рис. 27, 29) и равномерно накапливаются до 24 ч.

Для конъюгата DC6 наблюдается значительно более сложный паттерн расщепления РНК, чем для DC7. Наиболее примечательной особенностью DC6 является специфичность расщепления. Расщепление тРНК^{Phe} DC6 по участку 61-CACAG-65 происходит главным образом по связи G65-A66 (60% за 24 ч), причем скорость расщепления относительно медленная – плато достигается за 8 ч. По связям, расположенным рядом, (C63-A64 и A64-G65) также происходит расщепление, однако, со значительно меньшей эффективностью (10% и 1%, соответственно). Вне целевого участка DC6 расщепляет РНК исключительно по G-X связям, т.е. проявляет специфичность, характерную для T1 рибонуклеазы. Таким образом, «естественная» G-X специфичность, проявляемая DC6 в отношении отдаленных участков, сочетается со способностью расщеплять любые фосфодиэфирные связи, расположенной в непосредственной близости от пептида, хотя и со значительно меньшей эффективностью.

Равномерная кинетика накопления продуктов расщепления тРНК^{Phe}, характерная для DC7, в случае DC6 нарушена вследствие многоточечного расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом DC6. Большинство продуктов расщепления тРНК^{Phe} от G3 до G65 наблюдаются в реакционной смеси уже через 15 мин инкубации тРНК^{Phe} в присутствии DC6 (Рис.28, 30). В интервале 0.25-2 ч эти продукты равномерно накапливаются в реакционной смеси, после чего характер их накопления начинает различаться. Накопление продуктов G3-G34 через 2 ч достигает пика, а затем равномерно снижается к 24 ч до полного исчезновения. Продукты расщепления по целевому участку продолжают равномерно накапливаться, выходя к 24 ч на плато.

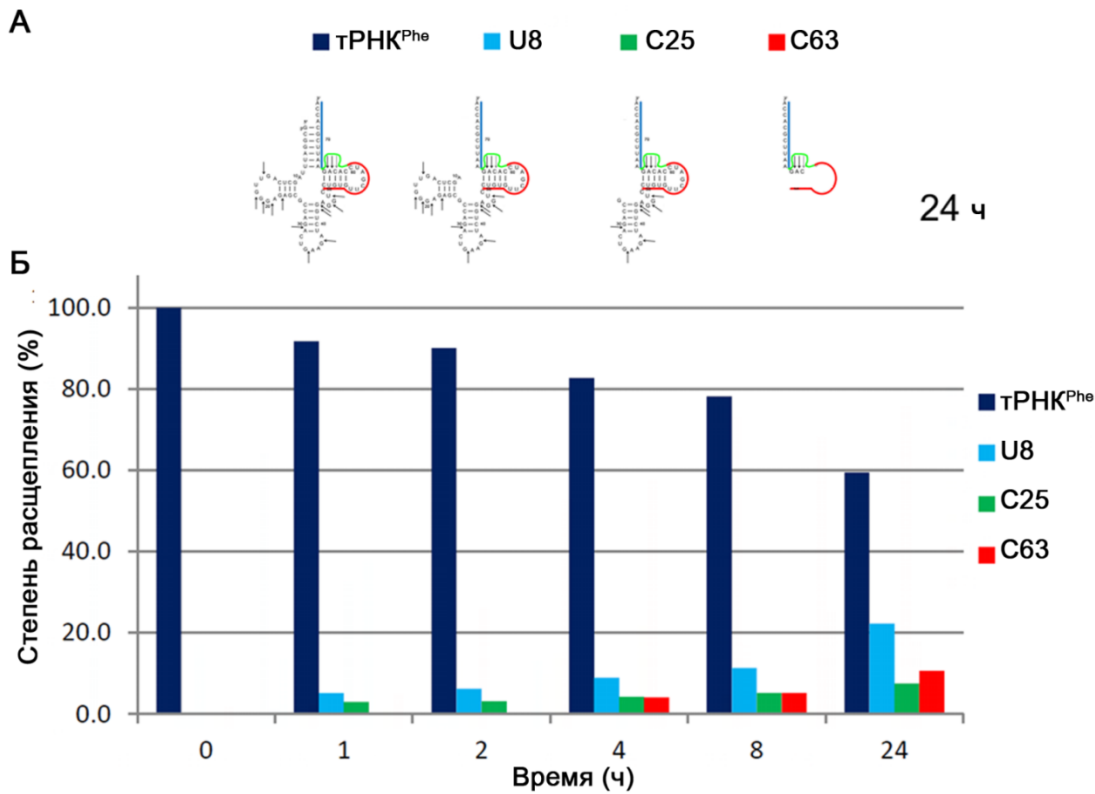


Рис. 29. Расщепление тРНК^{Phe} конъюгатом DC7. **А.** Схематическое представление основных продуктов расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом DC7. **Б.** Диаграмма, показывающая перераспределение продуктов расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом DC7 в зависимости от времени инкубации в присутствии конъюгата DC7.

Группа продуктов G42, G43, G45 и G46 занимает промежуточное положение: они накапливаются до 8 ч, а к 24 ч исчезают, за исключением G46, который в небольших количествах сохраняется до 72 ч инкубации. Таким образом, все продукты образуются вследствие первичного расщепления тРНК^{Phe}. Единственное исключение составляет продукт G71, появляющийся в реакционной смеси в заметных количествах только к 8 ч, а максимальное его количество наблюдается к 24 ч, после чего держится до 72 ч на одном уровне. Тот факт, что G71 появляется в реакционной смеси уже после исчезновения интактной тРНК^{Phe} при одновременном снижении уровня продуктов G3-G34, а затем и G42-G46, позволяет сделать вывод, что G71 образуется в результате вторичного, или многоточечного расщепления тРНК^{Phe}. Это означает, что конъюгат DC6 после расщепления тРНК^{Phe} по одной из связей G3-G46 способен катализировать еще один акт расщепления по связи G71-C72. Что касается продуктов расщепления по целевому участку (G65-A66 A64-G65 и C63-A64), то вопрос, вносит ли многоточечное расщепление вклад в их образование, или же они являются результатом исключительно первичного расщепления, остается открытым.

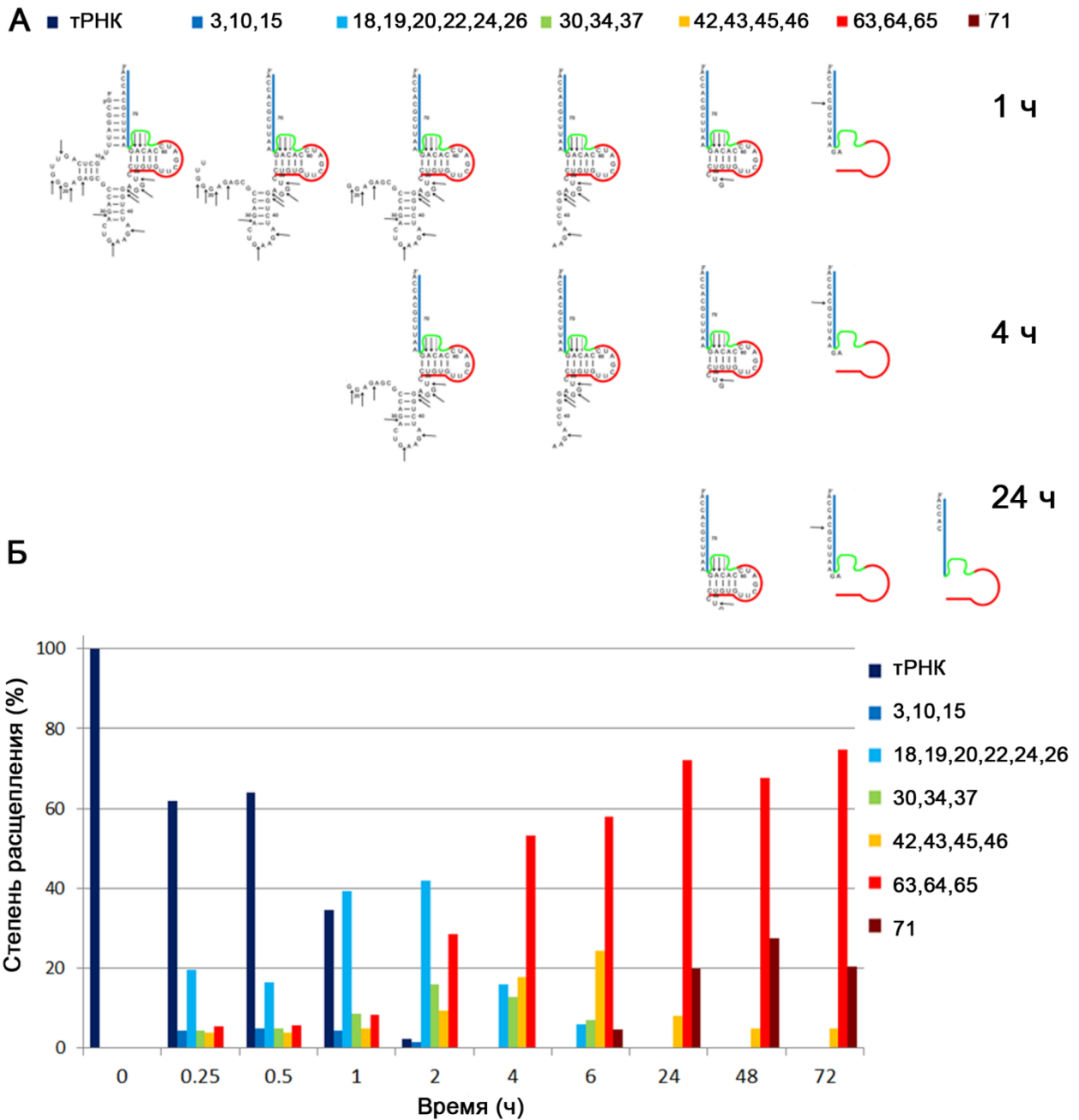


Рис. 30. Расщепление тРНК^{Phe} конъюгатом DC6. **А.** Схематическое представление основных продуктов расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом DC6. **Б.** Диаграмма, показывающая перераспределение продуктов расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом DC6 в зависимости от времени инкубации РНК в присутствии конъюгата DC6.

Расщепление тРНК^{Phe} вне целевого участка обусловлено нарушением третичной структуры тРНК^{Phe}, вызванной связыванием с ней ОПК DC6. Даже частичное нарушение структуры способствует повышению конформационной подвижности связей и, как следствие, повышению вероятности их расщепления.

Тот факт, что введение одного остатка глицина в структуру двойного конъюгата кардинальным образом меняет его активность, хорошо согласуется с аналогичными результатами для линейных конъюгатов. В последнем случае менялась только интенсивность расщепления, в случае двойных конъюгатов меняется также и паттерн расщепления.

3.2.4.6 Оценка расстояний до сайтов расщепления

Используя имеющуюся в литературе кристаллическую структуру тРНК^{Phe} и программное обеспечение МОЕ, мы измерили расстояние от точки крепления пептида к олигонуклеотиду (межнуклеотидный атом фосфора C60-p-C61) до сайтов расщепления. Измеренное расстояние служит оценкой возможности пептида дотянуться до сайта расщепления. Для DC7:тРНК комплекса расстояние до сайтов расщепления не превышало 33 Å (Рис. 31). Для DC6:тРНК^{Phe} комплекса расстояние до сайтов расщепления составило от 12.2 Å (C60-G18) до 54 Å (C60-G34) (Рис. 31).

Радиусом действия пептида в составе двойного конъюгата можно считать максимальное расстояние от атома фосфора (точки крепления линкера к олигонуклеотиду) до любого из атомов азота гуанидиновой группы аргинина (Рис. 32). Для оценки этого расстояния нами методами молекулярной динамики с помощью программы МОЕ была построена система, включающая пептид и фланкирующие его линкеры. Когда конъюгат находится в составе комплекса с тРНК^{Phe}, можно предположить, что расстояние между точками крепления линкеров к олигонуклеотиду сохраняется постоянным. Соответственно, мы ограничили это расстояние 21 Å. Несомненно, в комплексе это расстояние может варьировать, и степень вариации трудно оценить. Очевидно, однако, что вариации увеличивают радиус действия пептида. Таким образом, приняв ограничение 21 Å, мы вычислим минимальный радиус действия пептида в составе конъюгата. Полученный минимальный радиус для пептида составил 36 Å. Разумеется, это достаточно грубая оценка, не учитывающая такие факторы, как, например, взаимодействие конъюгата с тРНК^{Phe}, однако она позволяет иметь представление о возможностях пептида.

Из всех сайтов расщепления вне радиуса действия конъюгата находится только один сайт (G34-A35), расположенный на расстоянии 54 Å от точки крепления линкера. Все остальные сайты расщепления (G18-G19, G19-G20, G20-A21, G45-G46, G46-U47) находятся внутри радиуса действия пептида, расстояние до любого из них не превышает 25.4 Å. тРНК^{Phe} обладает определенной конформационной гибкостью, тем более выраженной для транскрипта, используемого в реакции, не включающего в состав стабилизирующие структуру модифицированные основания. Лабильность структуры тРНК^{Phe} еще сильнее повышается вследствие отсутствия в реакционной смеси ионов магния. Наконец, взаимодействие с

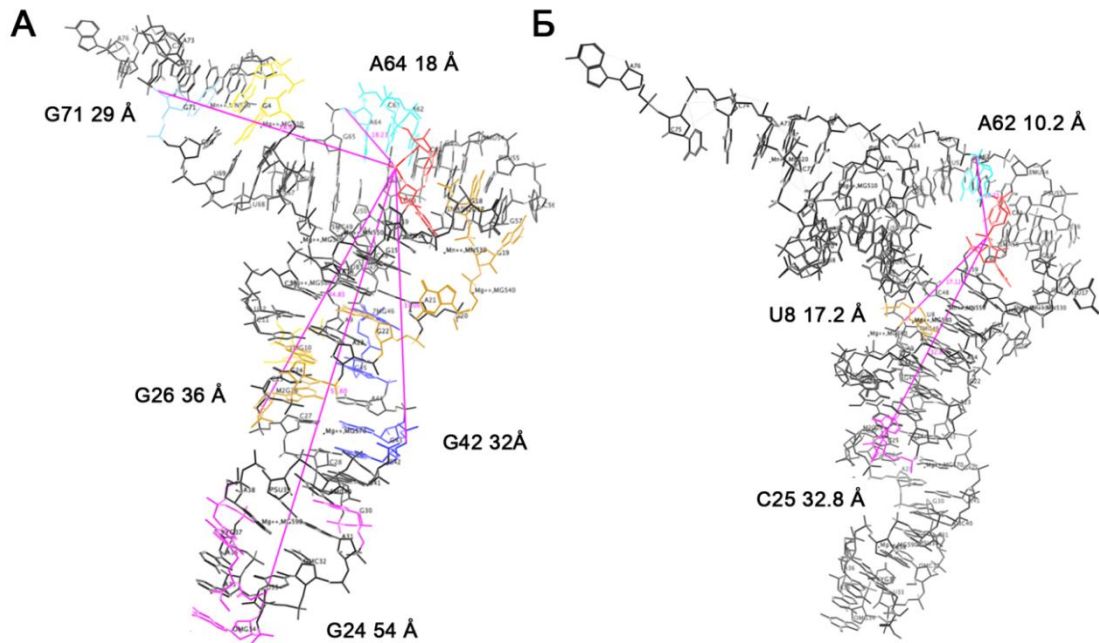


Рис. 31. Кристаллическая структура тРНК^{Phe} и радиус действия конъюгатов DC6 и DC7. Линиями обозначены расстояния между точкой присоединения пептида (С60-р-С61, красный) и основными сайтами расщепления тРНК^{Phe} конъюгатами DC6 (А) и DC7 (Б).

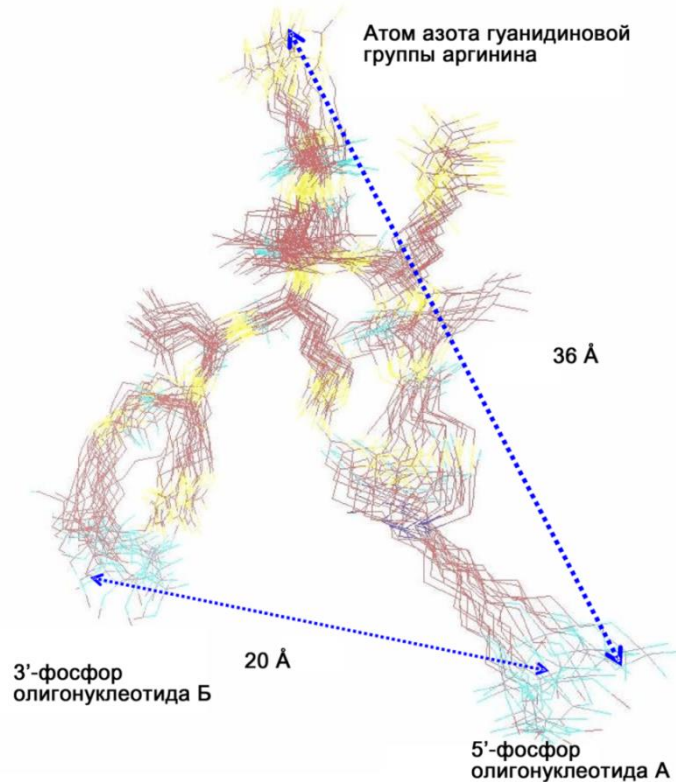


Рис. 32. Структура пептида Mal-[LRLRG]₂, полученная программой МОЕ. Указаны расстояние между крайними атомами фосфора узнающих доменов А и Б, зафиксированное при проведении молекулярной симуляции (20 Å) и максимальное расстояние от крайнего атома фосфора до атома азота гуанидиновой группы аргинина (36 Å, радиус действия конъюгата DC6).

конъюгатами разворачивает L-структуру тРНК^{Phe}. Создание методами молекулярной динамики системы, включающей и конъюгат, и тРНК^{Phe}, позволило бы точно ответить на вопрос о достигаемости конъюгатом тех или иных фосфодиэфирных связей, а в перспективе и предсказать расщепление связей на любой мишени. На данный момент мы ограничились приблизительной оценкой.

3.2.4.7 Концентрационные зависимости расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe}

Конъюгаты использовались в реакции расщепления в избытке по отношению к тРНК^{Phe} (20 μ М конъюгат, 1 μ М тРНК^{Phe}). Конъюгаты проектировались с расчетом взаимодействия с мишенью 1:1, однако нельзя исключать, что несколько молекул конъюгата могут одновременно взаимодействовать с тРНК^{Phe}. Ранее были продемонстрированы подобные кооперативные взаимодействия РНК для другого типа искусственных рибонуклеаз [271]. В целях исследования этого вопроса мы исследовали расщепление тРНК^{Phe} конъюгатами при разных соотношениях РНК:конъюгат. Кривые зависимости расщепления тРНК^{Phe} от концентрации имеют сигмоидный характер, в отличие от кривых связывания, имеющих обычный экспоненциальный вид. Кроме того, для кривых расщепления характерен лаг-период до 5 μ М, когда расщепления не наблюдается (Рис. 33).

Существуют два возможных сценария, объясняющих сигмоидный характер кривых и наличие лаг-периода. Согласно первому сценарию, конъюгат при образовании комплекса может принять активную или неактивную конформацию, или, точнее, одну из нескольких возможных таких конформаций. Поскольку избыток конъюгата находится в равновесии с комплексом тРНК^{Phe}:конъюгат, при высокой концентрации конъюгата вероятность образования продуктивного комплекса повышается, что и приводит к повышению степени расщепления. Отметим, что аналогичная картина наблюдалась нами и для конъюгатов первой серии (линейных конъюгатов). Вторым возможным сценарием является кооперативное взаимодействие нескольких молекул конъюгата с одной молекулой тРНК^{Phe}. Образование таких комплексов между РНК и несколькими молекулами РНКаз ранее было подтверждено экспериментально [271].

3.2.4.8 Расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатом DC6 в условиях многооборотной реакции

Реакцию проводили при двукратном избытке тРНК^{Phe} над конъюгатом в течение 72 ч. За 24 ч степень расщепления тРНК^{Phe} достигает максимума, равного 50% (Рис. 34). В течение дальнейшей инкубации до 72 ч не наблюдалось изменения ни паттерна, ни степени расщепления тРНК^{Phe}. Количественное и качественное 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 М тРНК^{Phe}, 20 μ М DC6).

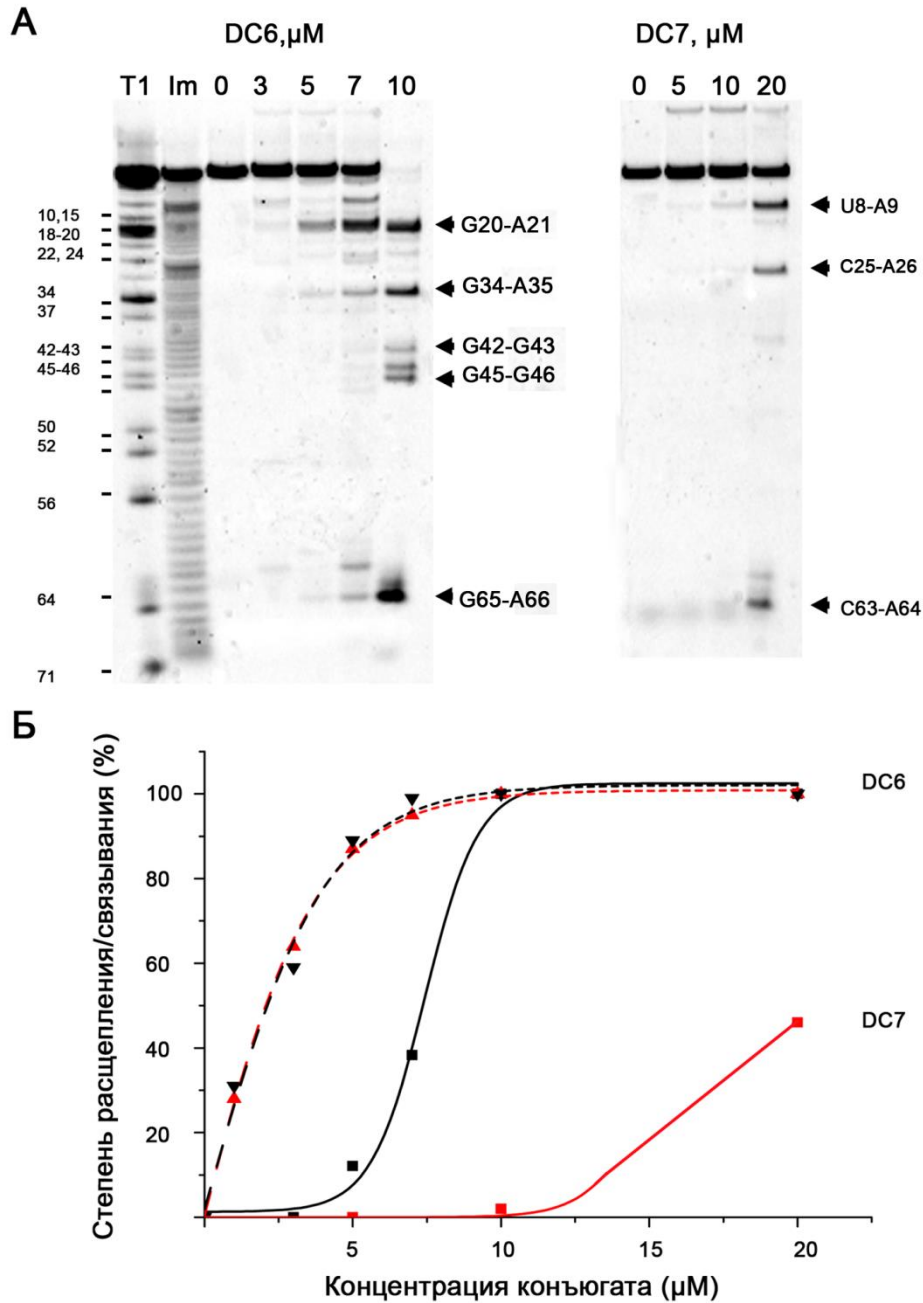


Рис. 33. Зависимость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} DC6 и DC7 от концентрации конъюгата. **А.** Примеры разделения продуктов расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами DC6 и DC7 в 12% ПААГ. T1 и Im, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. C, 3'-FITC-тРНК^{Phe}, инкубированная в течение 24 ч в отсутствие конъюгатов. Сsites расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Концентрационные зависимости связывания (пунктирная линия) и расщепления (сплошная линия) 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами DC6 и DC7.

В целом, наблюдаемые факты объяснить несколько затруднительно. Однако, учитывая неизменность степени расщепления в интервале 24-72 ч, можно предположить отсутствие действия конъюгата DC6 в каталитическом режиме, независимо от того, участвует ли в реакции одна или несколько молекул. В противном случае мы наблюдали бы постепенное, возможно, медленное, но неуклонное снижение уровня тРНК^{Phe} в реакционной смеси.

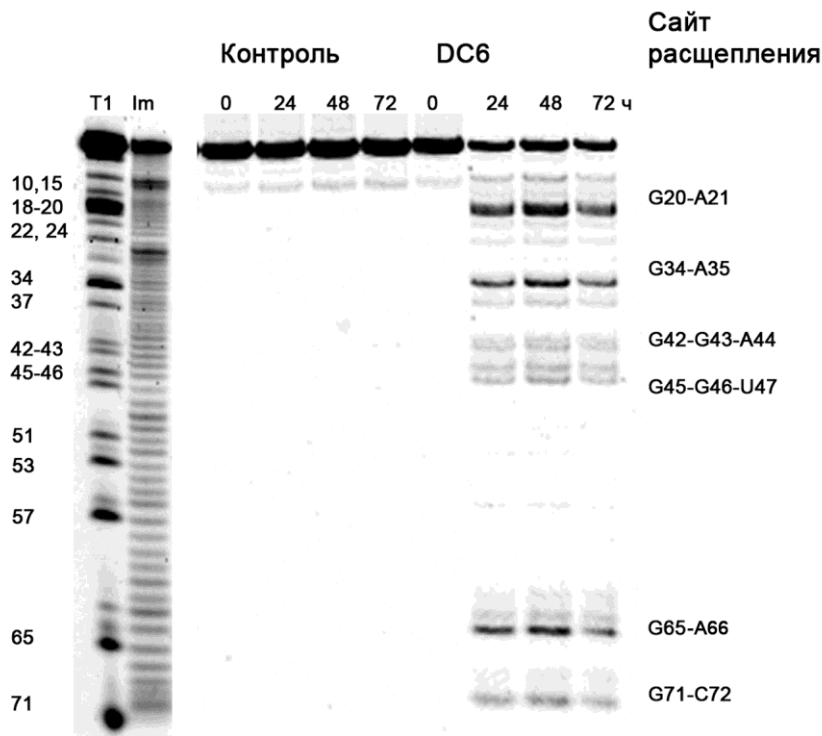


Рис. 34. Расщепление тРНК конъюгатом DC6 в условиях многооборотной реакции. T1 и Im, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 М имидазольном буфере, соответственно. Контроль, 3'-FITC-тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие конъюгатов в течение 24, 48 и 72 ч. Сайты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно.

Расщепление ровно 50% тРНК^{Phe} говорит против второго описанного сценария, т.е. кооперативного расщепления РНК несколькими конъюгатами. Кооперативное взаимодействие нескольких молекул конъюгата с тРНК^{Phe} и каталитическое действие, таким образом, представляется менее вероятным, чем гипотеза существования активных и неактивных конформаций ОПК.

3.2.4.9 Заключение

Двойные ОПК представляют собой класс соединений – иРНКаз, предназначенных для сайт-направленного расщепления РНК. Особенностью строения двойных конъюгатов является наличие двух РНК-узнающих доменов - олигонуклеотидов, фланкирующих пептид,

выполняющий каталитическую функцию. Исследованы свойства 11 двойных конъюгатов, направленных против тРНК^{Phe}, различающихся длиной и структурой пептида, олигонуклеотидов и соединяющих их линкеров. Исследование структурно-функциональной зависимости активности двойных ОПК выявило закономерности, как общие для двойных линейных ОПК, так и специфические для двойных ОНК. Так, значительная роль глицина в обеспечении конформационной подвижности пептида, необходимой для эффективного расщепления РНК, показанная для линейных ОПК, была подтверждена также и для двойных ОПК. В случае двойных ОПК роль глицина оказалась даже большей, поскольку его включение в состав пептида изменило не только степень, но и паттерн расщепления тРНК^{Phe}.

Для двойных ОПК значительно более важной оказалась структура линкера. Если в линейных ОПК достаточно было фосфамидного линкера, то необходимым условием активности двойного ОПК оказалось наличие протяженного гибкого линкера. Вероятно, ограничение подвижности, накладываемое на пептид в двойных ОПК наличием второго олигонуклеотида, должно компенсироваться линкером.

Только для двойных ОПК актуальным является дополнительный параметр – расстояние между РНК-узнающими доменами, правильный выбор которого оказывает решающее влияние на рибонуклеазную активность ОПК.

Наконец, специфичность расщепления зависит от того, происходит ли расщепление по целевому участку или вне его – это свойство оказалось характерным как для линейных, так и для двойных ОПК.

3.2.5 «Петлеобразующие» конъюгаты – конъюгаты пептида и адресующего олигонуклеотида, индуцирующие формирование петли в РНК-мишени

3.2.5.1 Дизайн петлеобразующих конъюгатов

При создании различных типов как металл-зависимых [219], так и металл-независимых иРНКаз [245,246] неоднократно применялся принцип расщепления РНК-мишени по боковой петле, формируемой в структуре РНК при связывании с ней иРНКазы. Главной особенностью таких иРНКаз является присоединение каталитического агента не к концевому, а к одному из внутренних нуклеотидов РНК-адресующего домена. В случае линейных иРНКаз стабильность комплекса иРНКазы с РНК-мишенью не изменяется после расщепления, поскольку степень связывания иРНКазы с РНК-мишенью должна быть достаточно высокой для осуществления расщепления, для линейных иРНКаз трудно ожидать протекания реакции расщепления в каталитическом режиме. В случае петлеобразующих иРНКаз адресующий домен до расщепления РНК связан с одним протяженным участком РНК, а после расщепления – с двумя

участками, каждый из которых примерно вдвое короче. В результате, после расщепления РНК-мишени повышается вероятность диссоциации петлеобразующей иРНКазы из комплекса, для чего требуется экспериментально подобрать длину РНК-адресующего домена. Последовательность РНК-адресующего домена подбирается таким образом, чтобы в структуре РНК-мишени при связывании с иРНКазой формировалась боковая петля длиной 2-6 н, а каталитический домен располагался в непосредственной близости от этой петли. Ранее было показано, что петли длиной 3-6 нуклеотидов, сформированные олигонуклеотидом в структуре фрагмента М2 РНК вируса гриппа эффективно расщепляются низкомолекулярными иРНКазами [270]. Использование иРНКаз, формирующих петли, в некоторых случаях обеспечивает расщепление РНК по петле, в том числе в каталитическом режиме [245].

Ввиду полного отсутствия данных о закономерностях протекания реакции трансэтерификации в искусственных боковых петлях РНК-мишени в качестве исходных ОПК были разработаны петлеобразующие конъюгаты двух типов (Рис. 35). В качестве мишени использована тРНК^{Phe}, РНК-адресующий олигонуклеотид был комплементарен АСС-стеблю и ТЧС-петле. При связывании тРНК^{Phe} с конъюгатом боковая петля формируется в участке С61-С65. Конъюгаты первого типа (bulge-inducing conjugates, далее – ВС) представлены серией из четырех соединений: ВС2, ВС3, ВС4 и ВС5, цифра в названии ОПК одновременно указывает число нуклеотидов в боковой петле, предположительно формируемой в тРНК^{Phe} при связывании с соответствующим конъюгатом. Длина РНК-адресующих доменов ОПК этого типа составляет 22, 21, 20 и 19 нуклеотидов, причем 5'-участок олигонуклеотида полностью комплементарен АСС-стеблю с целью обеспечения прочного связывания [283]. Особенности, характерными для всех ОПК данного типа, были тип каталитического пептида и способ его конъюгирования с олигонуклеотидом. В позиции 12 (расположена напротив G65 тРНК^{Phe}) каждого олигонуклеотида цитидин был заменен на модифицированный аденин, несущий в положении С8 аминоксильный линкер, который используется для присоединения пептида [LR]₄G-COOH, ранее продемонстрировавшем эффективное расщепление РНК *in vitro* в составе ОПК. В отличие от линейных ОПК, в петлеобразующих ОПК присоединение пептида к линкеру осуществлялось с С-конца. Поскольку в реакции конъюгирования участвуют аминоксильная группа аминоксильного линкера и карбоксильная группа пептида, аминоксильная группа пептида была защищена с помощью ацетильной группы во избежание циклизации пептида.

Серия конъюгатов второго типа (ВС-α) включает пять соединений: ВС2-α, ВС3-α, ВС4-α, ВС5-α и ВС5-L-α. направленных против того же участка тРНК^{Phe} и индуцирующих формирование в структуре РНК-мишени таких же боковых петель, что и конъюгаты ВС. Для

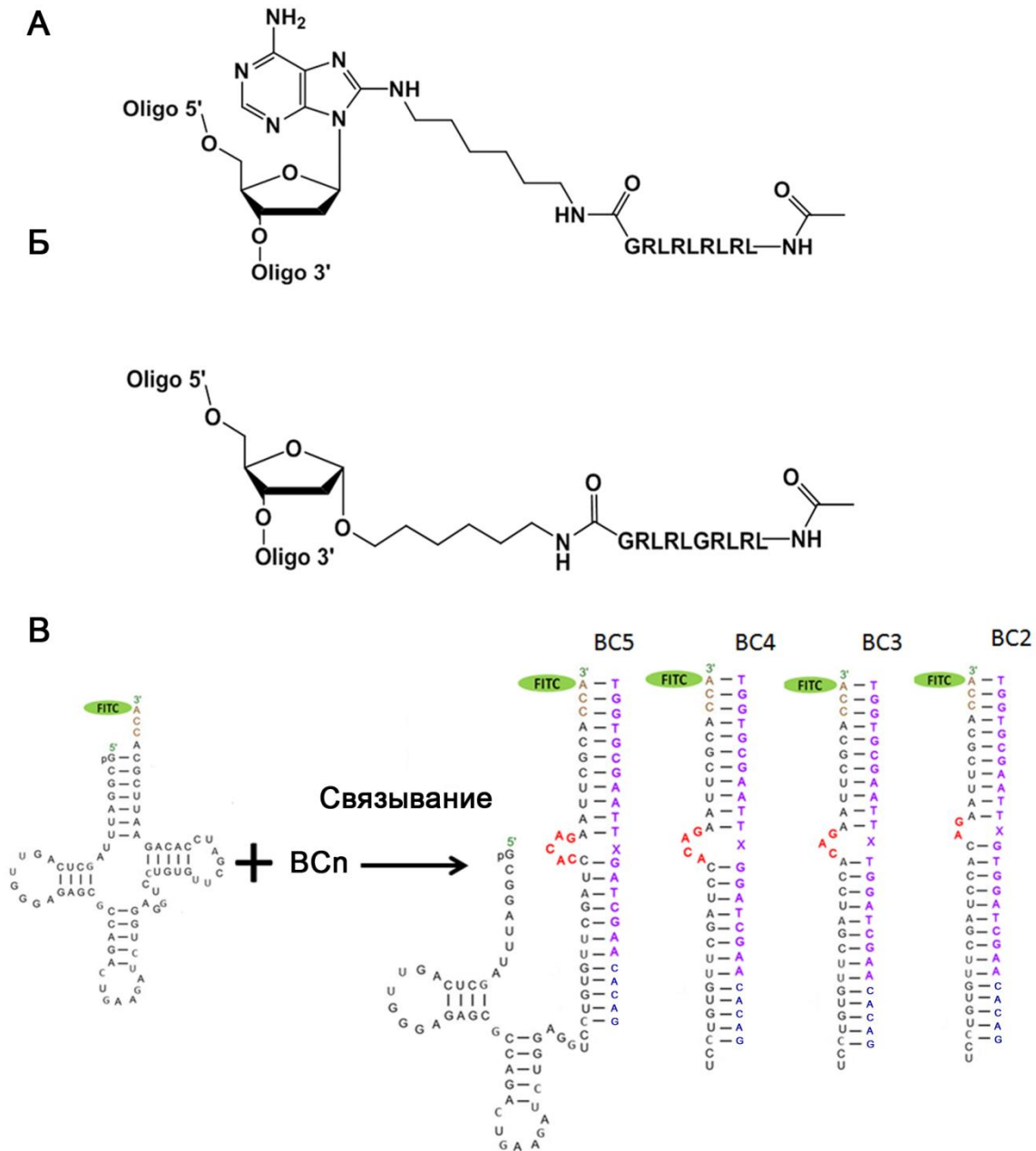


Рис. 35. Общая структура петлеформирующих конъюгатов BC2–BC5 (А) и BC2- α - BC5- α (Б), показывающая присоединение пептида к олигонуклеотиду либо через модифицированный аденозин, либо через С1' атом рибозы. В. Схематичное представление образования комплекса тРНК:BCn. Последовательность РНК-узнающего домена BCn показан фиолетовым, BCn- α – фиолетовым и синим. Петля, формируемая в структуре тРНК^{Phe}, показана красным. X – модифицированный нуклеотид, показанный на А и Б.

ОПК этой серии длина РНК-узнающего олигонуклеотида составляет 27, 26, 25, 24 и 27 звеньев, соответственно, включая расположенный напротив петли апуриновый/апиримидиновый сайт.

Прочное связывание ОПК с РНК-мишенью, обеспечиваемое более длинными РНК-узнающими фрагментами, мы считаем необходимым условием для расщепления тРНК. Конъюгаты BC5- α и BC5-L- α , формирующие одинаковую 5-звенную боковую петлю в

структуре тРНК^{Phe}, различаются длиной РНК-узнающего домена: ВС5-L-α длиннее на 3 звена. К рибозе апуринового/апиримидинового нуклеотида по С1'-положению присоединен аминоксильный линкер в α-конформации. Конъюгирование РНК-узнающего олигонуклеотида с пептидом осуществлялось аналогично конъюгатам ВС, включая ацетилирование аминоксильной группы пептида, однако в этой серии был использован другой пептид: Acetyl-[LRG]₂-COOH, содержащий в центре остаток глицина, чтобы обеспечить пептиду еще большую конформационную подвижность.

Эти два типа ОПК, ВС и ВС-α, можно рассматривать как первые пробные варианты петлеобразующих ОПК, изучение которых позволит получить данные о закономерностях протекания реакции трансэтерификации в боковых петлях РНК под действием каталитических пептидов.

3.2.5.2 Связывание петлеобразующих конъюгатов с тРНК^{Phe}

Способность конъюгатов гибридизоваться с тРНК^{Phe} была исследована методом задержки в геле. Формирующийся при связывании конъюгатов ВС с тРНК^{Phe} комплекс несовершенен вследствие образования петли в структуре РНК-мишени. Таким образом, хотя минимальная длина узнающего домена ВС составляет 19 нуклеотидов, можно ожидать более слабого связывания петлеобразующих конъюгатов по сравнению, например, с «линейными» конъюгатами, содержащими олигонуклеотид такой же или меньшей длины.

Среди конъюгатов первой серии ВС2, ВС3 и ВС4 связывают 100% тРНК (1 μМ) при концентрации 10-20 μМ, а ВС5 при концентрации 20 μМ связывает не более 5% тРНК (Рис. 36, Таблица 13). Константы связывания, определенные для ВС2, ВС3 и ВС4, примерно на порядок ниже констант связывания для линейных ОПК (длина узнающего домена последних 17 нуклеотидов). Для ВС5 константа связывания не была рассчитана, вследствие низкой степени связывания.

Узнающий домен конъюгатов серии ВС-α на 3 нуклеотида длиннее соответствующих доменов конъюгатов серии ВС. Такое удлинение повышает эффективность связывания и в некоторой степени нивелирует дестабилизирующий эффект боковой петли. Более прочное связывание конъюгатов ВС-α по сравнению с конъюгатами ВС, возможно, является фактором, способствующим расщеплению РНК-мишени. Следует отметить, что в целом конъюгаты ВС-α связываются с тРНК^{Phe} менее прочно, чем линейные конъюгаты (Таблицы 10, 13), что позволяет рассчитывать на возможность их диссоциации из комплекса тРНК^{Phe}:конъюгат после расщепления РНК и, таким образом, способность их действовать в каталитическом режиме.

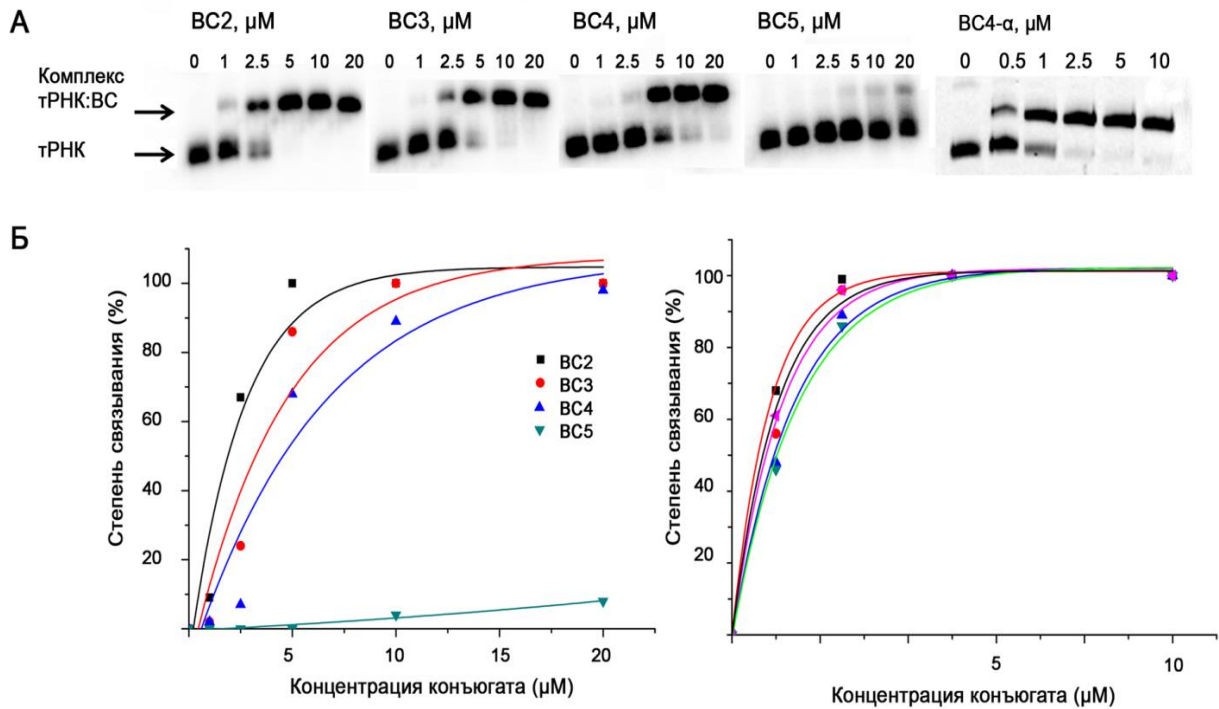


Рис. 36. Связывание конъюгатов BC2, BC3, BC4, BC5 и BC4- α с 3'-FITC-тРНК^{Phe} (1 μ M). А. Электрофореграммы нативного 12% ПААГ, показывающие связывание конъюгатов с 3'-FITC-тРНК^{Phe}. Тип конъюгата и концентрации указаны сверху. Стрелки показывают положение в геле свободной 3'-FITC-тРНК^{Phe} и комплекса 3'-FITC-тРНК^{Phe}:конъюгат. Б. Концентрационная зависимость связывания конъюгатов BC2, BC3, BC4, BC5 (левая панель), BC2- α , BC3- α , BC4- α , BC5- α , BC5L- α (правая панель) с 3'-FITC-тРНК^{Phe}.

3.2.5.3 Пробинг структуры комплекса тРНК^{Phe}:BCn РНКазой А

С целью доказательства формирования в участке С60-G65 боковой петли при связывании с тРНК^{Phe} была исследована структура тРНК^{Phe} в комплексе с конъюгатами серии BC с помощью РНКазы А (Рис. 37), расщепляющей Руг-А связи только в одноцепочечных участках РНК [296]. В отсутствие конъюгатов РНКазы А индуцирует заметное расщепление только по одному сайту – U8-A9 (Рис. 37). При связывании конъюгатов тРНК^{Phe} разворачивается, и сразу несколько участков молекулы РНК становятся доступными для расщепления РНКазой А. Так, мишенью для расщепления РНКазы А становится участок С61-G65, что говорит о формировании боковой петли при связывании тРНК^{Phe} с конъюгатами. Расщепление в боковой петле происходит в присутствии конъюгатов BC3, BC4 и BC5, но не в присутствии конъюгата BC2, индуцирующего формирование петли 64-AG-65. Примечательно, что хотя конъюгаты BC3, BC4 и BC5 формируют петли разного размера (63-CAG-65, 62-ACAG-65, 61-CACAG-65, соответственно), паттерн расщепления по петлям РНКазой А идентичен для всех трех конъюгатов: основное расщепление происходит по связи С63-A64, а расщепление по связям А62-С63 и С61-A62 происходит незначительно. Отсутствие расщепления петли AG

Таблица 13. Петлеобразующие конъюгаты: обозначение, последовательность РНК-узнающего домена, константы ассоциации с тРНК^{Phe} (Ka).

Название ОПК	Oligonucleotide (5'→3')	Ka*10 ⁶ M ⁻¹	Степень расщепления тРНК ^{Phe} , %, 72 ч
BC2	TGGTGCGAATT-A*-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 ^α -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 аминоксильным линкером

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

РНКазой А свидетельствует о необходимости выбора более оптимальной петли для расщепления при создании петлеобразующих иРНКаз. Особенно следует отметить эффективное расщепление тРНК^{Phe} РНКазой А по связи С63-А64, что свидетельствует о формировании боковой петли в присутствии конъюгата BC5, хотя эффективность связывания BC5 с тРНК^{Phe} очень низка.

В участках тРНК^{Phe} вне сформированной петли также происходит расщепление РНКазой А в присутствии ОПК. Значительное расщепление, причем с близкими эффективностями для всех четырех ОПК, происходит по связи U8-А9, а для BC2, BC3, BC4 в этом же участке расщепляется еще и связь С14-А15. Такой результат был в принципе ожидаем, поскольку связывание ОПК с тРНК^{Phe} разворачивает аминоксильный стебель тРНК^{Phe} и увеличивает доступность близлежащих участков. Интересно, что связывание тРНК^{Phe} с BC5 не индуцирует расщепление связи С14-А15 РНКазой А. Можно предположить, что D-петля, которая в нативной тРНК^{Phe} вступает в третичные взаимодействия с ТΨС-петлей, в присутствии связывающего ТΨС-петлю ОПК BC5 взаимодействует с петлей 61-САСАG-65 и становится недоступной для РНКазы А.

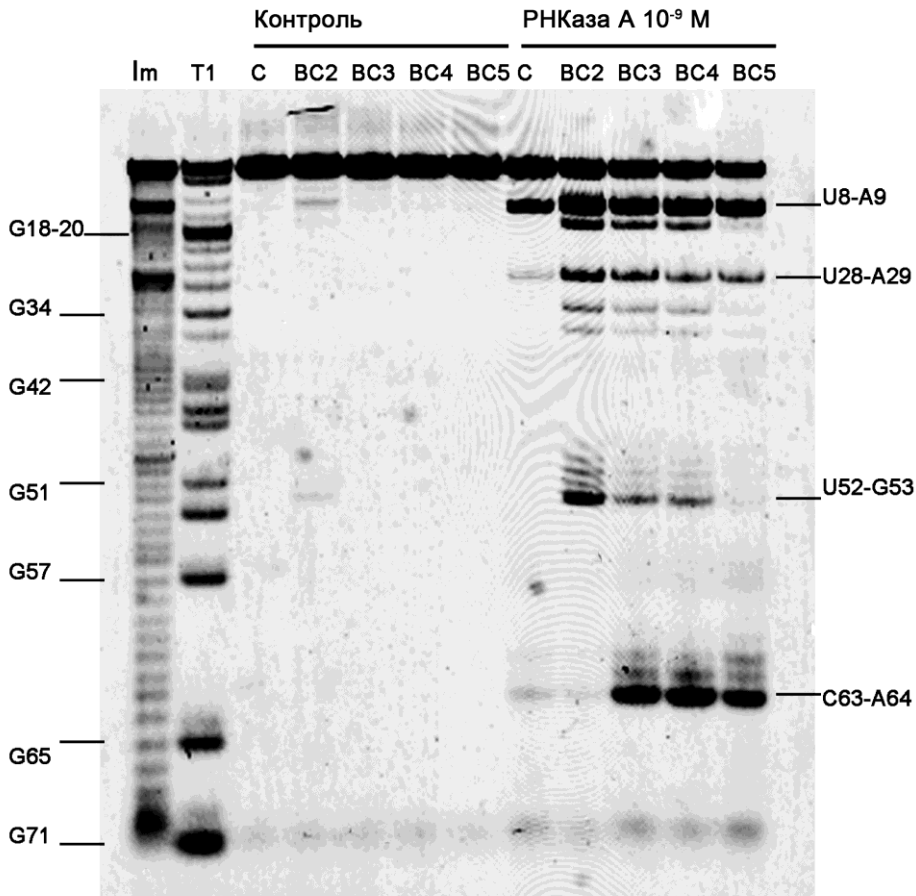


Рис. 37. Пробинг РНКазой А структуры 3'-FITC-тРНК^{Phe} в комплексе 3'-FITC-тРНК^{Phe}:конъюгат. Электрофореграмма 12% денатурирующего ПААГ. «Контроль» и «РНКаза А» сверху показывают образцы, инкубированные в отсутствие и в присутствии РНКазы А, соответственно. 3'-FITC-тРНК^{Phe} (1 μ М) инкубировали в присутствии одного из конъюгатов BC2, BC3, BC4 или BC5 (20 μ М) 20 мин при 37°C, затем добавляли РНКазу А (1 нМ) и инкубировали 10 мин при 37°C. С, 3'-FITC-тРНК^{Phe} (1 μ М), инкубированная в отсутствие конъюгатов. Im и T1, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} в 2 М имидазольном буфере и РНКазой T1, соответственно. Сайты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой А и T1 показаны справа и слева, соответственно.

Среди других участков доступным для расщепления РНКазой А становится антикодоновый стебель: в присутствии всех ОПК расщепляется связь C28-A29, а в присутствии BC2, BC3 или BC4, кроме того, расщепляются связи U33-G34 и A36-G37. Степень расщепления последних двух связей крайне мала и падает в ряду конъюгатов BC2>BC3>BC4.

Наконец, совершенно неожиданно, доступным для расщепления РНКазой А в присутствии BC2 и, в значительно меньшей степени, BC3 и BC4 оказывается связь U52-G53. Соответствующий участок, предположительно, находится в дуплексе с РНК-узнающим доменом ОПК. Возможное объяснение этого факта заключается в том, что дуплекс в этом участке непрочный, «дышащий», однако, в таком случае, трудно объяснить снижение

эффективности расщепления по связи U52-G53 в ряду BC2>BC3≈BC4>>BC5, поскольку прочность дуплекса в этом ряду также убывает.

Пробинг структуры комплекса тРНК^{Phe}:BCn РНКазой А позволяет сделать следующий вывод: петлеобразующие конъюгаты BC2, BC3, BC4 и BC5 при связывании с тРНК^{Phe} индуцируют в ее структуре формирование боковой петли, доступной для расщепления, причем доступность связей в петле к расщеплению РНКазой А падает в ряду BC5≈BC4≈BC3>>BC2. Связывание ОПК с тРНК^{Phe} разворачивает ее структуру, делая отдаленные участки доступными для расщепления.

3.2.5.4 Расщепление тРНК^{Phe} конъюгатами BCn; роль последовательности петли

Способность петлеобразующих конъюгатов расщеплять тРНК была проанализирована в условиях, ранее использованных для других типов конъюгатов (37°C, 50 мМ Трис-Cl pH 7.0, 0.2 М KCl, 1 мМ EDTA).

Петлеобразующие конъюгаты серии BC не расщепляли тРНК^{Phe} ни по петле, ни по другим участкам. Единственным исключением оказался конъюгат BC2, для которого наблюдалось слабое (не более 5% в течение 24 ч) расщепление тРНК^{Phe} по связям вне целевого участка по связи U8-A9, известному «слабому» сайту тРНК^{Phe}.

Среди многочисленных факторов, определяющих возможность расщепления фосфодиэфирной связи, одним из важнейших является последовательность нуклеотидов, расположенных в непосредственной близости от расщепляемой связи, а в случае расщепления по петле – ее размер. Мы предположили, что конъюгат BC2, в принципе способный расщеплять РНК, не действует по петле “AG” вследствие того, что петля очень короткая и нет связей, чувствительных к расщеплению, т.е. структура петли не оптимальна. Чтобы проверить это предположение, мы использовали пять олигорибонуклеотидов, первичная структура которых повторяет последовательность тРНК^{Phe} за исключением петли (Таблица 14). Вместо последовательности «5'-AG-3'» в тРНК^{Phe} в химерных олигорибонуклеотидах использовали последовательности: 5'-CACA-3', 5'-UAUA-3', 5'-CGCA-3', 5'-CAGCA-3' и 5'-CACAG-3'. Расщепление таких химерных РНК-мишеней показало, что конъюгат BC2 расщепляет одну или две связи по петле в зависимости от ее последовательности и катализирует расщепление связи U4-G5 вне петли (Рис. 38, Таблица 14). Расщеплению подвергаются только Руг-А связи, тогда как другие связи остаются невредимыми как в 4-х-, так и 5-звенных петлях. 4-х-звенные петли расщепляются конъюгатом BC2 примерно вдвое лучше, чем 5-звенные, но общий уровень расщепления остается крайне невысоким: 5-6% и 2-2.6%, соответственно. Низкая степень расщепления РНК-мишени по оптимизированной боковой петле означает, что необходимо

оптимизировать структуру конъюгата, используя либо другой пептид, либо альтернативный способ присоединения пептида к олигонуклеотиду.

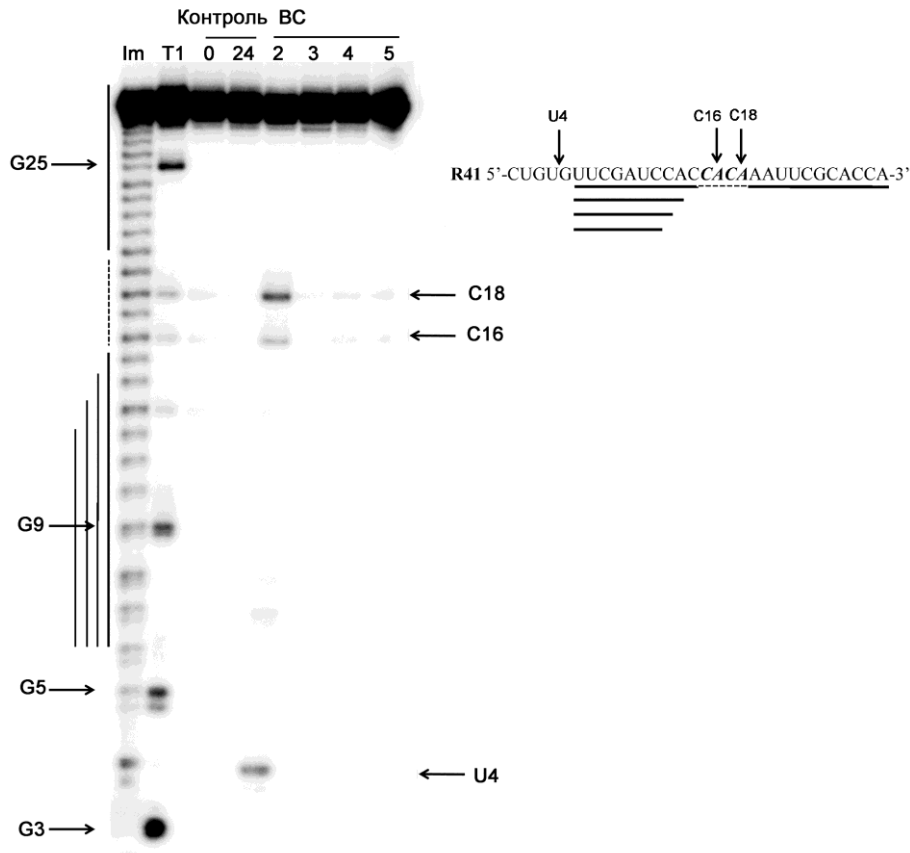


Рис. 38. Расщепление 5'-p³²-R41 петлеобразующими конъюгатами. Электрофореграмма 12% денатурирующего ПААГ. «Контроль» и «BC» сверху показывают образцы, инкубированные в отсутствие и в присутствии конъюгата, соответственно. 5'-p³²-R41 (1 μM) инкубировали в присутствии одного из конъюгатов BC2, BC3, BC4 или BC5 (20 μM) при 37°C в течение 24 ч. Im и T1, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} 2M имидазольным буфером и РНКазой T1, соответственно. Сайты расщепления 5'-p³²-R41 конъюгатом BC2 и РНКазой T1 показаны справа и слева, соответственно.

Таблица 14. Расщепление искусственных РНК-мишеней конъюгатом BC2.

Название	Последовательность (5'→3')	Общая степень расщепления, %	Степень расщепления по петле, %
R41	cugu↓guucgauccacC↓AC↓Aaauucgcacca	8.2	5.8
R42	cugu↓guucgauccacU↓AU↓Aaauucgcacc	10.5	5.0
R43	cugu↓guucgauccacCGC↓Aaauucgcacc	3.8	2.0
R51	cugu↓guucgauccacC↓AGC↓Aaauucgcacc	3.2	2.6
R52	cugu↓guucgauccacC↓AC↓AGAaauucgcacc	2.7	2.1

¹⁾ Стрелки ↓ показывают сайты расщепления олигорибонуклеотидов конъюгатом BC2.

В рамках имеющихся данных о расщеплении боковых петель РНК пептидами объяснить отсутствие расщепления тРНК конъюгатами ВС3, ВС4 и ВС5 довольно сложно. Единственным объяснением является недостаточно прочный комплекс ВС:тРНК и неоптимальное расположение пептида относительно связей в петле. На основании имеющихся данных о связывании олигонуклеотидов с тРНК [283] и пробинге комплексов ВС:тРНК РНКазой А можно предположить, что 3'-участок РНК-узнающего домена конъюгатов ВС образует с тРНК^{Phe} непрочный комплекс, в результате чего конъюгаты не проявляют рибонуклеазной активности.

3.2.5.5 Расщепление конъюгатами ВС- α тРНК^{Phe}

Конъюгаты серии ВС- α отличаются от конъюгатов серии ВС, во-первых, каталитическим пептидом – в случае ВС- α использован пептид [LRG]₂-COOH, содержащий в центре глицин, обеспечивающий его большую конформационную подвижность. Во-вторых, пептид присоединен через аминоксильный линкер к С1'-атому рибозы, а не к положению С8 аденина, как в конъюгатах серии ВС.

Анализ рибонуклеазной активности конъюгатов ВС- α проводили, используя тРНК^{Phe} и условия однооборотной реакции (1 μ М 3'-FITC-тРНК^{Phe}, 20 μ М конъюгат, 50 мМ Трис-НСl pH 7.0, 0.2 М КСl, 1 мМ EDTA) при 37°C, инкубация в течение 24 ч. Выяснилось, что за 24 ч реакция расщепления не выходит на плато для всех конъюгатов (Рис. 39), поэтому время инкубации было увеличено до 72 ч. В отсутствие конъюгатов спонтанного расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} в исследуемом временном интервале не наблюдалось (Рис. 39А, контрольные дорожки).

Все α -конъюгаты ВС- α расщепляли 3'-FITC-тРНК^{Phe} со сходной специфичностью, но с различной эффективностью. Наибольший интерес представляет расщепление тРНК^{Phe} по целевому участку, т.е. по петле. Конъюгат ВС2- α , индуцирующий образование петли А64-С65, не содержащей легко расщепляемых Руг-А связей, не способен расщеплять тРНК^{Phe} по петле. Общая степень расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом ВС2- α составляет 70% за 72 ч. Конъюгаты ВС3- α , ВС4- α , ВС5- α и ВС5L- α расщепляют тРНК^{Phe} по петле, главным образом по связи С63-А64 и в меньшей степени по А62-С63. В случае ВС5- α и ВС5L- α обнаруживаются также следовые количества продукта С61-А62, что, очевидно, связано с формированием этими конъюгатами более длинной 5-звенной петли. Кинетика накопления продуктов расщепления по петле более медленная по сравнению с кинетиками накопления других продуктов расщепления. Продукты, соответствующие расщеплению по связям после С63 и А62, появляются в реакционной смеси только к 24 ч, затем их количество постепенно растет до 72 ч. Степень расщепления тРНК^{Phe} по петле составляет: 10% для ВС5L- α (при общей степени расщепления

50% за 72 ч), 33% для ВС4- α (общая 85%), 65% для ВС3- α и 90% для ВС5- α . Общая степень расщепления тРНК^{Phe} для конъюгатов-лидеров ВС3- α и ВС5- α составляет 100% и достигается за 48 ч. Следует отметить, что накопление продуктов расщепления по петле продолжается и после 48 ч. Постепенное накопление С63 (и минорного продукта А62) сопровождается одновременной деградацией фрагмента U8-A9 (и, возможно, С28-A29). Подобный сдвиг спектра продуктов расщепления наблюдается также в случае исследованных нами двойных конъюгатов. Можно заключить, что петлеобразующие конъюгаты, так же как и двойные, индуцируют многоточечное расщепление тРНК^{Phe}, т.е. когда одна молекула тРНК^{Phe} расщепляется связанным с ней конъюгатом сразу по нескольким сайтам. Итогом процесса является накопление в смеси самых коротких продуктов реакции, содержащих концевую метку.

Было выделено два четко различимых паттерна расщепления. Конъюгаты ВС3- α , ВС4- α , ВС5- α и ВС5L- α помимо расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} целевому участку С61-G65 расщепляют и вне целевого участка по трем Руг-Х связям (U8-A9, С28-A29, слабое расщепление С40-U41). Таким образом, расщепление вне целевого сайта наблюдается нами для всех трех типов конъюгатов: линейных, двойных и петлеобразующих ОПК. Степень расщепления по отдельным сайтам отличается между конъюгатами, но паттерн сохраняется неизменным за незначительным исключением: ВС5L- α не расщепляет 3'-FITC-тРНК^{Phe} по связи С40-U41, а по связи С28-A29 происходит расщепление на грани уровня детекции. Таким образом, конъюгаты ВС3- α , ВС4- α , ВС5- α и ВС5L- α сочетают Руг-Х специфичность вне целевого участка с расщеплением 5'-СА-3' и 5'-АС-3' связей по петле. Вероятно, каталитический пептид расщепляет любые связи, находящиеся в непосредственной близости от него, так как повышается вероятность принятия пептидом конформации, выгодной для расщепления этой связи, тогда как в случае отдаленных связей «предпочитает» легко расщепляемые.

Совершенно отличный паттерн расщепления характерен для конъюгата ВС2- α . Он расщепляет 3'-FITC-тРНК^{Phe} только вне целевого участка по D-петле и антикодонной петле, причем проявляет G-X специфичность. Продукты расщепления 3'-FITC-tRNA^{Phe} конъюгатом ВС2- α накапливаются равномерно вплоть до 72 ч инкубации без каких-либо изменений паттерна, что говорит о том, что все продукты расщепления являются первичными, т.е. расщеплению подвергается исходная молекула 3'-FITC-tRNA^{Phe}, а не ее фрагменты. Таким образом, вновь происходит многоточечное расщепление молекулы тРНК^{Phe}, аналогично другим исследованным конъюгатам. Стоит отметить, что кривая расщепления тРНК^{Phe} конъюгатом ВС2- α так и не выходит на плато через 72 ч. Проявление конъюгатом ВС2- α G-X специфичности, тогда как другие ОПК серии проявляют Руг-Х специфичность, трудно объяснить.

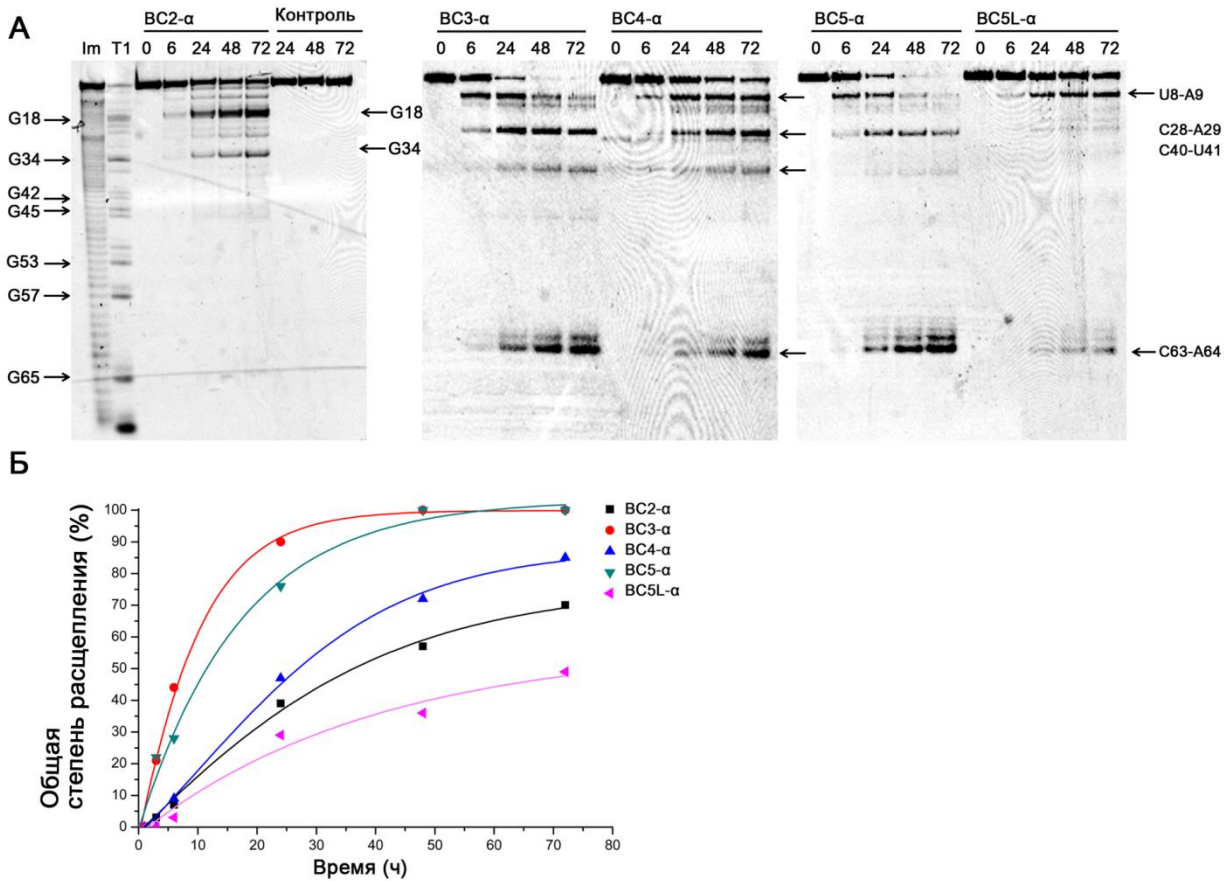


Рис. 39. Расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами BC2-α, BC3-α, BC4-α, BC5-α, и BC5L-α. **А.** Электрофореграмма разделения продуктов расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} (1 μM) конъюгатами BC2-α, BC3-α, BC4-α, BC5-α, и BC5L-α. (20 μM) в денатурирующем 12% ПААГ. T1 и Im, частичное расщепление 3'-FITC-тРНК^{Phe} РНКазой T1 и в 2 M имидазольном буфере, соответственно. С, 3'-FITC-тРНК^{Phe}, инкубированная в отсутствие конъюгатов в течение 24 ч. Сайты расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами и РНКазой T1 указаны справа и слева, соответственно. **Б.** Кинетики расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} конъюгатами BC2-α, BC3-α, BC4-α, BC5-α, и BC5L-α.

Подобное изменение типа специфичности расщепляемой связи характерно для различных типов ОПК. Исследованные в данной работе двойные конъюгаты DC6 и DC7 обладают G-X и Pур-А специфичностью, соответственно. Разные типы специфичности продемонстрированы для коротких ОПК не сайт-направленного действия [254]. Два типа специфичности расщепления наблюдалось для ОПК, направленных против миРНК, специфичность которых зависит от способа присоединения пептида к олигонуклеотиду: через С (G-X) или N-конец (Pур-X) [259].

В случае конъюгатов BC3-α and BC5-α паттерн расщепления 3'-FITC-tRNA^{Phe} меняется со временем, что связано с различной кинетикой накопления отдельных продуктов. Продукт U8 появляется в реакционной смеси через 6 ч, его количество достигает максимума через 24 ч, затем постепенно снижается до нуля. К 72 ч в смеси остаются только следовые количества продукта U8. Предположительно, BC3-α and BC5-α расщепляют фрагмент U8 с образованием

короткого фрагмента С63. Конъюгаты ВС4-α и ВС5L-α также расщепляют U8, хотя и в меньшей степени. Продукт С28 появляется в смеси через 6 ч, кривая накопления достигает плато к 24 ч, остается на примерно одном уровне (в пределах погрешности) до 72 ч. Фрагмент С28 в значительном количестве образуется под действием ВС3-α и ВС4-α. Конъюгат ВС5-α расщепляет тРНК^{Phe} с меньшей эффективностью, конъюгат ВС5L-α индуцирует еле заметное (на границе детекции) расщепление по данному сайту.

Два крайне интересных факта требуют объяснения. Во-первых, конъюгат ВС5L-α значительно слабее расщепляет тРНК^{Phe}, чем ВС5-α. Конъюгаты ВС5-α и ВС5L-α индуцируют образование 5-звенной петли 61-САСАG-65 в структуре тРНК^{Phe}, а единственным различием между ними является на 3 нуклеотида более длинный РНК-узнающий домен у ВС5L-α по сравнению с ВС5-α (Таблица 13). Известно, что третичные взаимодействия отдаленных участков РНК могут сильно влиять на структуру РНК [297,298], однако, вряд ли возможно было предсказать, что добавление трех нуклеотидов снизит активность конъюгата со 100% до 50%, а по петле – с 90% до 10%.

Во-вторых, лучшими расщепляющими агентами оказались конъюгаты ВС3-α и ВС5-α (100% общая степень расщепления, 70-90% расщепления по петле), формирующих трех и пятизвенные петли, тогда как ВС4-α, формирующий промежуточную четырехзвенную петлю, оказался значительно менее активным (85% и 30%, соответственно). Эти данные говорят о том, что трех- и пятизвенные петли в большей степени подвержены расщеплению, чем четырехзвенные. Эксперименты с олигорибонуклеотидами R41, R42, R43, R44 и R45 показали противоположные результаты. Скорее всего, эффективность расщепления по петле зависит не только от ее длины и последовательности, но и от типа расщепляющего агента, в частности, от последовательности пептида и/или метода его присоединения к олигонуклеотиду.

3.2.5.6 Концентрационная зависимость расщепления конъюгатами ВС-α тРНК^{Phe}

Зависимость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} от концентрации конъюгата исследовали в диапазоне концентраций конъюгатов от 1 до 40 μМ (Рис. 40). Кривые расщепления образуют две группы. Конъюгаты ВС3-α, ВС5-α и ВС2-α формируют сигмоидные кривые, достигающие плато при 15-20 μМ. Такой вид кривых мы наблюдали ранее для двойного ОПК DC6. Для конъюгатов ВС4-α и ВС5L-α характерно также сигмоидное увеличение степени расщепления тРНК^{Phe} в зависимости от концентрации ОПК, причем при 40 μМ плато не достигается. Общим для всех ОПК серии ВСn-α является лаг-период до 5 μМ, при котором не наблюдается расщепления, однако, 100% РНК связано конъюгатом.

Эти результаты вполне ожидаемы, поскольку линейные и двойные конъюгаты ведут себя схожим образом. Важно отметить также, что при повышении концентрации конъюгата паттерн расщепления тРНК^{Phe} не изменяется, т.е. не появляется новых расщепляемых связей во всем диапазоне исследованных концентраций. Можно предположить две гипотезы, объясняющие такое поведение конъюгатов. Первая, это гипотеза «продуктивного» комплекса, согласно которой при формировании комплекса тРНК^{Phe}:конъюгат пептид может оказаться в нескольких альтернативных конформациях, из которых только часть способна индуцировать расщепление РНК. Данная гипотеза предполагает, что существует равновесие между свободным конъюгатом и конъюгатом в комплексе, причем одна молекула может переходить из одного состояния в другое. При повышении концентрации конъюгата повышается вероятность того, что РНК-мишень столкнется с конъюгатом в активной конформации. Вторая гипотеза предполагает взаимодействие нескольких молекул конъюгата с одной молекулой РНК-мишени. Подобное взаимодействие описано для двух олигонуклеотидов и тРНК^{Phe} [283]. В работе показано, что неполная гибридизация первого олигонуклеотида частично нарушает структуру тРНК, тем самым облегчая взаимодействие с тРНК второго олигонуклеотида, который и формирует с тРНК полноразмерный дуплекс. На данный момент нет прямых доказательств правильности той или иной гипотезы, но они обе объясняют имеющиеся экспериментальные данные, и могут быть приняты, как рабочие.

В ходе исследования двух серий петлеобразующих ОПК впервые было продемонстрировано расщепление РНК по петле, формируемой в структуре РНК при связывании с ОПК. Была подтверждена значимость для расщепления РНК длины и последовательности петли. 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.

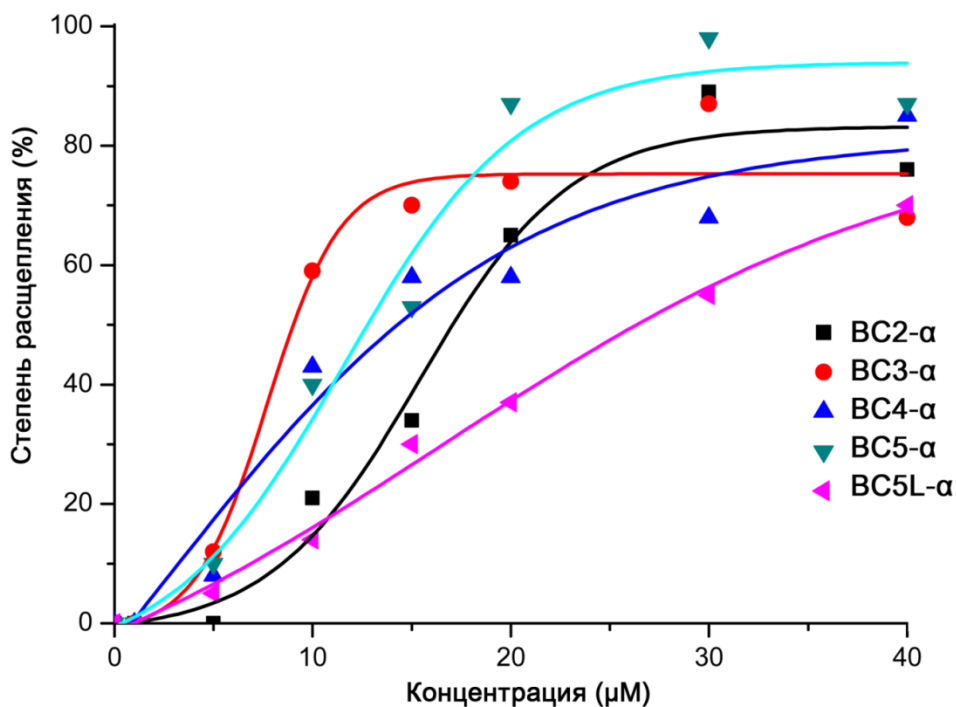


Рис. 40. Концентрационная зависимость расщепления 3'-FITC-тРНК^{Phe} (1 μM) конъюгатами BC2-α, BC3-α, BC4-α, BC5-α, и BC5L-α. Паттерн расщепления остается неизменным в диапазоне концентраций 5-40 μM.

Заключение

В настоящей работе мы исследовали реакцию трансэтерификации РНК, протекающую по механизму нуклеофильного замещения S_N2 в результате атаки атома кислорода в 2'-положении рибозы на смежный атом фосфора. Данная реакция играет огромную биологическую роль, обеспечивая возможность расщепления РНК в клетке, возможность расщепления и лигирования РНК в процессе сплайсинга, рекомбинации вирусных геномов, рекомбинации РНК в пребиотических условиях. В рамках данной работы интерес представляла реакция трансэтерификации, катализируемая иРНКазами направленного действия — олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК), а также общие закономерности протекания данной реакции, зависимость возможности ее протекания от вторичной и третичной структуры РНК. Для исследования закономерностей протекания реакции трансэтерификации была исследована модельная система, состоящая 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 Mg^{2+} . Была показана возможность протекания реакции

трансэтерификации в двух направлениях - расщепления и лигирования, причем последовательность этих реакций приводит к формированию целого спектра продуктов рекомбинации РНК. Анализ полученного спектра продуктов позволил установить, что реакции трансэтерификации не являются случайными, вторичная и третичная структура РНК направляет их протекание по определенным участкам. Структура РНК предопределяет формирование долгоживущих комплексов с протяженными двуцепочечными участками, которые обеспечивает специфическое протекание реакции лигирования с образование группы продуктов, имеющих сходную структуру, но отличающихся последовательностью в точке лигирования.

В данной работе мы исследовали определенный класс РНК-направленных препаратов – олигонуклеотид-пептидные конъюгаты, катализирующие расщепление РНК по механизму трансэтерификации. Впервые в данной работе для ОПК была продемонстрирована возможность количественного сайт-направленного расщепления модельной РНК - тРНК^{Phe} из дрожжей, причем для трех различных видов 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. Так, катализируемая ОПК различных видов реакция трансэтерификации 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 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 видом конъюгата, последовательностью пептида. Здесь стоит отметить, что выбранный в качестве целевого участок расщепления 61-САСАG-65 относится к «слабым» сайтам тРНК^{Phe}. В ходе исследований выявлена важная роль конформационной подвижности каталитического пептида, которая обеспечивается наличием глицина в структуре пептида и протяженными гибкими линкерами. Впервые для ОПК показана принципиальная возможность расщепления РНК в условиях многооборотной реакции.

Таким образом, в целом наша работа представляет серьезный шаг в развитии особого класса искусственных рибонуклеаз направленного действия – олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, а также предоставляет новые данные о влиянии вторичной и третичной 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 за счет расщепления РНК в культурах клеток и *in vivo*. При переходе от модельных ОПК к ОПК, действующим в клетке на терапевтически значимые РНК, ассоциированные с каким-либо паталогическим

процессом, необходимо будет использовать устойчивые к нуклеазам аналоги олигонуклеотидов в качестве РНК-узнающего домена. В случае протяженных РНК-мишеней, формирующих сложную вторичную и третичную структуры, актуальным будет выбор «слабых» сайтов – участков, подвергающихся расщеплению в наибольшей степени. Именно к таким участкам должны быть направлены создаваемые ОПК. Кроме того, следует учитывать, что ОПК при связывании с РНК-мишенью изменяет ее структуру, индуцируя появление открытых «слабых» участков, выполняя функцию, аналогичную функции ON-матрицы в исследованной нами системе.

Выводы

1. Исследовано поведение модельной системы, состоящей из двух 96-звенных фрагментов вирусных РНК и олигонуклеотида-матрицы, частично комплементарного каждой из РНК, в условиях, обеспечивающих возможность протекание спонтанной реакции трансэтерификации, катализируемой только ионами Mg^{2+} .

- 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-G65 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 $(LR)_4G-NH_2$. 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 пептид РНК-узнающих доменов, расстояние между участками связывания которых должно быть не менее 5 нуклеотидов.

- Показано, что специфичность расщепления РНК двойными ОПК (Pug-A или G-X) определяется последовательностью пептида: ОПК с пептидом $(LR)_4G$ расщепляют РНК по связям Pug-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 Pug-X, либо G-X, в зависимости от вида конъюгата и последовательности пептида.

Список литературы

1. Friedman R.C., Farh K.K.-H., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // *Genome Res.* - 2009. - V.19. - P. 92–105.
2. Chen J., Xue Y. Emerging roles of non-coding RNAs in epigenetic regulation // *Sci. China Life Sci.* - 2016. - V. 59. - P. 227–235.
3. Pullirsch K. Ng, D., Leeb M., Wutz A. Xist and the order of silencing // *EMBO Rep.* - 2007. - V. 8 - P. 34–39.
4. Li Y., Breaker R.R. Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group // *J. Am. Chem. Soc.* - 1999. - V. 121 23 - P. 5364-5372
5. Hombach S., Kretz M., Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning, // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2016. - V. 937. - P. 3–17.
6. Wei J.-W., Huang K., Yang C., Kang C.-S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics // *Oncol. Rep.* - 2017. - V. 37. - P. 3–9.
7. Vendramin R., Marine J., Leucci E. Non-coding RNAs: the dark side of nuclear–mitochondrial communication // *EMBO J.* - 2017. - V. 36. - P. 1123–1133.
8. Wang J., Samuels D., Zhao S., Xiang Y., Zhao Y.-Y., Guo Y. Current Research on Non-Coding Ribonucleic Acid (RNA) // *Genes (Basel).* - 2017. - V. 8. - P. 366.
9. Peschansky V.J., Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation // *Epigenetics.* - 2014. - V. 9. - P. 3–12.
10. Oliveto S., Mancino M., Manfrini N., Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer // *World J. Biol. Chem.* - 2017. - V. 8. - P. 45–56.
11. Dana H., Chalbatani G.M., Mahmoodzadeh H., Karimloo R., Rezaiean O., Moradzadeh A., Mehmandoost N., Moazzen F., Mazraeh A., Marmari V., Ebrahimi M., Rashno M.M., Abadi S.J.,

Gharagouzlo E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA // *Int. J. Biomed. Sci.* - 2017. - V.13. - P. 48–57.

12. Siomi M.C., Sato K., Pezic D., Aravin A.A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2011. - V. 12. - P. 246–258.

13. Matera A.G., Terns R.M., Terns M.P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2007. - V. 8. - P. 209–220.

14. Spurgers K.B., Sharkey C.M., Warfield K.L., Bavari S. Oligonucleotide antiviral therapeutics: Antisense and RNA interference for highly pathogenic RNA viruses // *Antiviral Res.* - 2008. - V. 78. - P. 26–36.

15. Hegarty J.P., Stewart D.B. Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2018. - V.102. - P. 1055–1065.

16. Kole R., Krainer A.R., Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2012. - V. 11. - P. 125–40.

17. Bull S.C., Doig A.J. Properties of Protein Drug Target Classes // *PLoS One.* - 2015. - V. 10(3): e0117955.

18. Sridharan K., Gogtay N.J. Therapeutic nucleic acids: current clinical status // *Br. J. Clin. Pharmacol.* - 2016. - V. 82. - P. 659–672.

19. Kaczmarek J.C., Kowalski P.S., Anderson D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality // *Genome Med.* - 2017. - V. 9. 60.

20. Barata P., Sood A.K., Hong D.S. RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: Current status and future directions // *Cancer Treat. Rev.* - 2016. - V. 50. - P. 35–47.

21. Mansoor M., Melendez A.J. Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics // *Gene Regul. Syst. Bio.* - 2008. - V. 2. - P. 275–95.

22. Crooke S.T. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides // *Nucleic Acid Ther.* - 2017. - V. 27. - P. 70–77.
23. Chan J.H., Lim S., Wong W.F. Antisense Oligonucleotides: from design to therapeutic applications // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* - 2006. - V. 33. - P. 533–540.
24. Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohammed A., Malhotra P. Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2003. - V. 67. - P. 657–85.
25. Lam J.K.W., Chow M.Y.T., Zhang Y., Leung S.W.S. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* - 2015. - V. 4.
26. Bader A.G., Brown D., Stoudemire J., Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer // *Gene Ther.* - 2011. - V. 18. - P. 1121–1126.
27. van Rooij E., Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age // *EMBO Mol. Med.* - 2014. - V. 6. - P. 851–864.
28. Lermer L., Roupioz Y., Ting R., Perrin D.M. Toward an RNaseA mimic: A DNAzyme with imidazoles and cationic amines // *J. Am. Chem. Soc.* - 2002. - V. 124. - P. 9960–1.
29. Purnick P.E.M., Weiss R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2009. - V. 10. - P. 410–422.
30. Pyle A.M., Chu V.T., Jankowsky E., Boudvillain M. Using DNAzymes to cut, process, and map RNA molecules for structural studies or modification // *Methods Enzymol.* - 2000. - V. 317. - P. 140–6.
31. Huber P.W. Chemical nucleases: their use in studying RNA structure and RNA-protein interactions // *FASEB J.* - 1993. - V. 7. - P. 1367–75.
32. Breaker R.R. Engineered allosteric ribozymes as biosensor components // *Curr. Opin. Biotechnol.* - 2002. - V. 13. - P. 31–9.

33. Lützelberger M., Kjems J. Strategies to Identify Potential Therapeutic Target Sites in RNA // HEP. - 2006. - V. 173. - P. 243–259.
34. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues // Tetrahedron Lett. 1967. - V. 37. - P. 3557–62.
35. Grineva N.I., Karpova G.G. Complementary addressed alkylation of ribosomal RNA with alkylating derivatives of oligonucleotides // Mol. Biol. - 1974. - V. 8. - P. 832–44.
36. Grineva N.I., Karpova G.G., Kuznetsova L.M., Uimitova T.A., Venkstern T.B., Complementary 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. - V. 10. - P. 1260–71.
37. 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. - 1977. - V. 74. - P. 4370–4.
38. Zamecnik P.C., Stephenson M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1978. - V. 75. - P. 280–4.
39. Stephenson M.L., Zamecnik P.C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1978. - V. 75. - P. 285–8.
40. Kurreck J., Wyszko E., Gillen C., Erdmann V.A. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids // Nucleic Acids Res. - 2002. - V. 30. - P. 1911–8.
41. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications // Postdoc J. a J. Postdr. Res. Postdr. Aff. - 2016. - V. 4. - P. 35–50.
42. Crooke S.T. Progress in Antisense Technology // Annu. Rev. Med. - 2004. - V. 55. - P. 61–95.

43. Eckstein F. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: What Is Their Origin and What Is Unique About Them? // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* - 2000. - V. 10. - P. 117–121.
44. Vitravene Study Group, A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS // *Am. J. Ophthalmol.* - 2002. - V. 133. - P. 467–74.
45. Geary R.S., Norris D., Yu R., Bennett C.F. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2015. - V. 87. - P. 46–51.
46. Crooke S.T. Progress in antisense technology: The end of the beginning // *Methods Enzymol.* - 2000. - V.313. - P. 3–45.
47. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications // *Eur. J. Biochem.* - 2003. - V. 270. - P. 1628–44.
48. Levin A.A. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1999. - V. 1489. - P. 69–84.
49. Agrawal S., Jiang Z., Zhao Q., Shaw D., Cai Q., Roskey A., Channavajjala L., Saxinger C., Zhang R., Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo studies // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1997. - V. 94. - P. 2620–5.
50. Crooke S.T., Geary R.S. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B // *Br. J. Clin. Pharmacol.* - 2013. - V. 76. - P. 269–276.
51. Li N., Li Q., Tian X.-Q., Qian H.-Y., Yang Y.-J. Mipomersen is a Promising Therapy in the Management of Hypercholesterolemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials // *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* - 2014. - V. 14. - P. 367–376.
52. Stein C.A., Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017 // *Mol. Ther.* - 2017. -V. 25. - P. 1069–1075.
53. Hua Y., Sahashi K., Hung G., Rigo F., Passini M.A., Bennett C.F., Krainer A.R.

Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model // *Genes Dev.* - 2010. - V. 24. - P. 1634–44.

54. Chen X., Dudgeon N., Shen L., Wang J.H. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development // *Drug Discov. Today.* - 2005. - V. 10. - P. 587–593.

55. Fluiter K., ten Asbroek A.L., de Wissel M.B., Jakobs M.E., Wissenbach M., Olsson H., Olsen O., Oerum H., Baas F. In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* -2003. - V. 31. - P. 953–62.

56. Sazani P., Gemignani F., Kang S.-H., Maier M.A., Manoharan M., Persmark M., Bortner D., Kole R. Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues // *Nat. Biotechnol.* - 2002. - V. 20. - P. 1228–1233.

57. Devi G.R., Beer T.M., Corless C.L., Arora V., Weller D.L., Iversen P.L. In vivo Bioavailability and Pharmacokinetics of a c-MYC Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer, AVI-4126, in Solid Tumors // *Clin. Cancer Res.* -2005. - V. 11. - P. 3930–3938.

58. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D.A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic Acid analogues // *Acta Naturae.* -2014. - V. 6. - P. 116–8.

59. Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D. V., Fokina A.A., Stetsenko D.A. New oligodeoxynucleotide derivatives containing N-(methanesulfonyl)-phosphoramidate (mesyl phosphoramidate) internucleotide group // *Russ. J. Bioorganic Chem.* -2017. - V. 43. - P. 664–668.

60. 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. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2019. - V. 116. - P. 1229–1234.

61. Crooke S.T. Molecular mechanisms of action of antisense drugs // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1999. - V. 1489. - P. 31–44.

62. Donis-Keller H. Site specific enzymatic cleavage of RNA // *Nucleic Acids Res.* - 1979.

- V. 7 . - P. 179–92.

63. Baker B.F., Monia B.P. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1999. - V. 1489. - P. 3–18.

64. Vickers T.A., Crooke S.T. The rates of the major steps in the molecular mechanism of RNase H1-dependent antisense oligonucleotide induced degradation of RNA // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - V. 43. - P. 8955–8963.

65. Zhang H.-L., Si L.-B., Zeng A., Long F., Qi Z., Zhao R., Bai M. MicroRNA-21 antisense oligonucleotide improves the sensitivity of A375 human melanoma cell to Cisplatin: An in vitro study // *J. Cell. Biochem.* - 2018. - V. 119. - P. 3129–3141.

66. Westermann P., Gross B., Hoinkis G. Inhibition of expression of SV40 virus large T-antigen by antisense oligodeoxyribonucleotides // *Biomed. Biochim. Acta.* - 1989. - V. 48. - P. 85–93.

67. Chiang M.Y., Chan H., Zounes M.A., Freier S.M., Lima W.F., Bennett C.F. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms // *J. Biol. Chem.* - 1991. - V. 266. - P. 18162–71.

68. Stein C.A. Eteplirsen Approved for Duchenne Muscular Dystrophy: The FDA Faces a Difficult Choice // *Mol. Ther.* - 2016. - V. 24. - P. 1884–1885.

69. Stein C.A., Benimetskaya L., Mani S. Antisense Strategies for Oncogene Inactivation // *Semin. Oncol.* -2005. - V. 32. - P. 563–572.

70. Lebedeva I. Cellular delivery of antisense oligonucleotides // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2000. - V. 50. - P. 101–119.

71. Kedmi R., Ben-Arie N., Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation // *Biomaterials.* - 2010. - V. 31. - P. 6867–6875.

72. Nabel G.J., Nabel E.G., Yang Z.Y., Fox B.A., Plautz G.E., Gao X., Huang L., Shu S., Gordon D., Chang A.E. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression,

biologic activity, and lack of toxicity in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1993. - V. 90. - P. 11307–11.

73. Lewis J.G., Lin K.Y., Kothavale A., Flanagan W.M., Matteucci M.D., DePrince R.B., Mook R.A., Hendren R.W., Wagner R.W., Wagner R.W. A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1996. - V. 93. - P. 3176–81.

74. 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. - V. 123. - P. 59–70.

75. Puchkov P.A., Kartashova I.A., Shmendel E. V., Luneva A.S., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A. Spacer structure and hydrophobicity influences transfection activity of novel polycationic gemini amphiphiles // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2017. - V. 27. - P. 3284–3288.

76. Takaku H., Mizuta T., Fujiwara M., Hatta T., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Shigeta S., Yokota T. Antisense oligonucleotides directed against the viral RNA polymerase gene enhance survival of mice infected with influenza A // *Nat. Biotechnol.* - 1999. - V. 17. - P. 583–587.

77. Jarver P., Langel U. The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation // *Drug Discov. Today.* - 2004. - V. 9. - P. 395–402.

78. Huang Y. Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* - 2017. - V. 6. - P. 116–132.

79. Lysik M.A., Wu-Pong S. Innovations in Oligonucleotide Drug Delivery // *J. Pharm. Sci.* - 2003. - V. 92. - P. 1559–1573.

80. Gusachenko (Simonova) O., Kravchuk Y., Konevets D., Silnikov V., Vlassov V., Zenkova M. Transfection Efficiency of 25-kDa PEI-Cholesterol Conjugates with Different Levels of Modification // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* - 2009. - V. 20. - P. 1091–1110.

81. Gusachenko (Simonova) O.N., Pishnyi D. V., Vlassov V. V., Zenkova M.A. Modified Concatemeric Oligonucleotide Complexes: New System for Efficient Oligonucleotide Transfer into

Mammalian Cells // Hum. Gene Ther. - 2008. - V. 19. - P. 532–546.

82. U S Food and Drug Administration Home Page, (n.d.). <https://www.fda.gov/> (accessed February 2, 2018).

83. Keam S.J. Inotersen: First Global Approval // Drugs. - 2018. - V. 78. - P. 1371–1376.

84. Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A. Chemical modification of siRNA // Curr. Opin. Mol. Ther. - 2010. - V. 12. - P. 158–67.

85. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. - 1998. - V. 391. - P. 806–811.

86. Bobbin M.L., Rossi J.J. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 2016. - V. 56. - P. 103–122.

87. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells // Nature. - 2001. - V. 411. - P. 494–498.

88. Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells // Genes Dev. - 2002. - V. 16. - P. 948–58.

89. Burke J.M., Kincaid R.P., Aloisio F., Welch N., Sullivan C.S. Expression of short hairpin RNAs using the compact architecture of retroviral microRNA genes // Nucleic Acids Res. - 2017. - V.45. - e154–e154.

90. Kim D.-H., Behlke M.A., Rose S.D., Chang M.-S., Choi S., Rossi J.J. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy // Nat. Biotechnol. - 2005. - V. 23. - P. 222–6.

91. Ambros V. The functions of animal microRNAs // Nature. - 2004. - V. 431. - P. 350–355.

92. Fischer S.E.J. RNA Interference and MicroRNA-Mediated Silencing // *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. - 2015. - P. 26.1.1-26.1.5.
93. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets // *Cell*. - 2005. - V. 120. - P. 15–20.
94. Friedman R.C., Farh K.K.-H., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // *Genome Res.* - 2008. - V. 19. - P. 92–105.
95. Lynam-Lennon N., Maher S.G., Reynolds J.V. The roles of microRNA in cancer and apoptosis // *Biol. Rev.* - 2009. - V. 84. - P. 55–71.
96. Daniels S.M., Sinck L., Ward N.J., Melendez-Peña C.E., Scarborough R.J., Azar I., Rance E., Daher A., Pang K.-M., Rossi J.J. A. Gatignol, HIV-1 RRE RNA acts as an RNA silencing suppressor by competing with TRBP-bound siRNAs // *RNA Biol.* - 2015. - V. 12. - P. 123–35.
97. Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi // *Nat. Biotechnol.* - 2003. - V. 21. - P. 635–637.
98. Minks M.A., West D.K., Benvin S., Baglioni C. Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells // *J. Biol. Chem.* - 1979. - V. 254. - P. 10180–3.
99. Kleinman M.E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J.Z., Albuquerque R.J.C., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y., Appukuttan B., Gibbs D., Yang Z., Karikó K., Ambati B.K., Wilgus T.A., DiPietro L.A., Sakurai E., Zhang K., Smith J.R., Taylor E.W., Ambati J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3 // *Nature*. - 2008. - V. 452. - P. 591–597.
100. Robbins M., Judge A., MacLachlan I. siRNA and innate immunity // *Oligonucleotides*. - 2009. - V. 19. - P. 89–102.
101. Forsbach A., Nemorin J.-G., Montino C., Müller C., Samulowitz U., Vicari A.P., Jurk

M., Mutwiri G.K., Krieg A.M., Lipford G.B., Vollmer J. Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses // *J. Immunol.* - 2008. - V. 180. - P. 3729–38.

102. Marques J.T., Williams B.R.G. Activation of the mammalian immune system by siRNAs // *Nat. Biotechnol.* - 2005. - V. 23. - P. 1399–1405.

103. Chiu Y.-L., Rana T.M. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis // *RNA.* - 2003. - V. 9. - P. 1034–48.

104. Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machermer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C.S., Jeffs L.B., Judge A., MacLachlan I., Polisky B. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs // *Nat. Biotechnol.* - 2005. - V. 23. - P. 1002–1007.

105. Morrissey D.V., Blanchard K., Shaw L., Jensen K., Lockridge J.A., Dickinson B., McSwiggen J.A., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C.S., Polisky B.A., Zinnen S. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication // *Hepatology.* - 2005. - V. 41. - P. 1349–56.

106. Karikó K., Buckstein M., Ni H., Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA // *Immunity.* - 2005. - V. 23. - P. 165–75.

107. Judge A.D., Bola G., Lee A.C.H., MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo // *Mol. Ther.* - 2006. - V. 13. - P. 494–505.

108. Ui-Tei K., Naito Y., Zenno S., Nishi K., Yamato K., Takahashi F., Juni A., Saigo K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect // *Nucleic Acids Res.* - 2008. - V. 36. - P. 2136–51.

109. Jackson A.L., Burchard J., Leake D., Reynolds A., Schelter J., Guo J., Johnson J.M., Lim L., Karpilow J., Nichols K., Marshall W., Khvorova A., Linsley P.S. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing // *RNA.* - 2006. - V. 12. -

P. 1197–205.

110. Bramsen J.B., Laursen M.B., Damgaard C.K., Lena S.W., Babu B.R., Wengel J., Kjems J. Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs // *Nucleic Acids Res.* - 2007. - V. 35. - P. 5886–97.

111. Bramsen, M.B. Laursen, A.F. Nielsen, T.B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, B.R. Babu, T. Højland, M. Abramov, A. Van Aerschot, D. Odadzic, R. Smicius, J. Haas, C. Andree, J. Barman, M. Wenska, P. Srivastava, C. Zhou, D. Honcharenko, S. Hess, E. Müller, G. V Bobkov, S.N. Mikhailov, E. Fava, T.F. Meyer, J. Chattopadhyaya, M. Zerial, J.W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel, J. Kjems J.B. A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity // *Nucleic Acids Res.* - 2009. - V. 37. - P. 2867–81.

112. Kennedy S., Wang D., Ruvkun G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans* // *Nature.* - 2004. - V. 427. - P. 645–9.

113. Hauptenthal J., Baehr C., Zeuzem S., Piiper A. RNase A-like enzymes in serum inhibit the anti-neoplastic activity of siRNA targeting polo-like kinase 1 // *Int. J. Cancer.* - 2007. - V. 121. - P. 206–10.

114. Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect // *Oligonucleotides.* - 2009. - V. 19. - P. 191–202.

115. Logashenko E.B., Vladimirova A.V., Volkov A.A., Repkova M.N., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L., Vlassov V.V., Suppression of MDR1 gene expression by chemically modified siRNAs // *Russ. Chem. Bull.* - 2006. - V. 55. - P. 1275–1283.

116. Song E., Lee S.-K., Wang J., Ince N., Ouyang N., Min J., Chen J., Shankar P., Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis // *Nat. Med.* - 2003. - V. 9. - P. 347–351.

117. Wittrup A., Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics // *Nat. Rev. Genet.* - 2015. - V. 16. - P. 543–52.

118. Reautschnig P., Vogel P., Stafforst T. The notorious R.N.A. in the spotlight - drug or target for the treatment of disease // *RNA Biol.* - 2017. - V. 14. - P. 651–668.
119. Reid G., Kao S.C., Pavlakis N., Brahmabhatt H., MacDiarmid J., Clarke S., Boyer M., van Zandwijk N. Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer // *Epigenomics.* - 2016. - V. 8. - P. 1079–85.
120. Chakraborty C., Sharma A.R., Sharma G., Doss C.G.P., Lee S.-S. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* - 2017. - V. 8. - P. 132–143.
121. Hoy S.M. Patisiran: First Global Approval // *Drugs.* - 2018. - V. 78. - P. 1625–1631.
122. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis // *Science.* - 2000. - V. 289. - P. 920–30.
123. Cech T.R. Ribozymes and their medical implications // *JAMA.* - 1998. - V. 260. - P. 3030–4.
124. Yuan Y., Hwang E.S., Altman S., Yuan Y., Hwang E.S., Altman S. Targeted cleavage of mRNA by human RNase P // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1992. - V. 89. - P. 8006–10.
125. Guerrier-Takada C., Li Y., Altman S. Artificial regulation of gene expression in *Escherichia coli* by RNase P // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1995. - V. 92. - P. 11115–9.
126. Yang Z., Vu G.-P., Qian H., Chen Y.-C., Wang Y., Reeves M., Zen K., Liu F. Engineered RNase P Ribozymes Effectively Inhibit Human Cytomegalovirus Gene Expression and Replication // *Viruses.* - 2014. - V. 6. - P. 2376–2391.
127. Sun, W. Chen, L. He, J. Sheng, Y. Liu, G.-P. Vu, Z. Yang, W. Li, P. Trang, Y. Wang, R. Hai, H. Zhu, S. Lu, F. Liu X. Inhibition of human cytomegalovirus immediate early gene expression and growth by a novel RNase P ribozyme variant // *PLoS One.* - 2017. - V. 12. - e0186791.
128. Li, J. Sheng, M. Xu, G.-P. Vu, Z. Yang, Y. Liu, X. Sun, P. Trang, S. Lu, F. Liu, W. Inhibition of Murine Cytomegalovirus Infection in Animals by RNase P-Associated External Guide

Sequences // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* - 2017. - V. 9. - P. 322–332.

129. Yu M., Ojwang J., Yamada O., Hampel A., Rapaport J., Looney D., Wong-Staal F. A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1993. - V. 90. - P. 6340–4.

130. zu Putlitz J., Yu Q., Burke J.M., Wands J.R. Combinatorial screening and intracellular antiviral activity of hairpin ribozymes directed against hepatitis B virus // *J. Virol.* - 1999. - V. 73. - P. 5381–7.

131. Welch P., Tritz R., Yei S., Barber J., Yu M. Intracellular application of hairpin ribozyme genes against hepatitis B virus // *Gene Ther.* - 1997. - V. 4. - P. 736–743.

132. Lévesque M. V., Perreault J.-P. Target-Induced SOFA-HDV Ribozyme // *Methods Mol. Biol.* - 2012. - P. 369–384.

133. Asif-Ullah M., Lévesque M., Robichaud G., Perreault J.-P. Development of ribozyme-based gene-inactivations; the example of the hepatitis delta virus ribozyme // *Curr. Gene Ther.* - 2007. - V. 7. - P. 205–16.

134. Lévesque D., Choufani S., Perreault J.-P. Delta ribozyme benefits from a good stability in vitro that becomes outstanding in vivo // *RNA.* - 2002. - V. 8. - P.464–77.

135. Khan A.U. Ribozyme: a clinical tool // *Clin. Chim. Acta.* - 2006. - V. 367. - P. 20–7.

136. Jose A.M. Ribozyme therapy: RNA enzymes to the rescue // *Yale J. Biol. Med.* - 2002. - V. 75. - P. 215–9.

137. Citti L., Rainaldi G. Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes // *Curr. Gene Ther.* - 2005. - V. 5. - P. 11–24.

138. Kruger K., Grabowski P.J., Zaug A.J., Sand J.S., Gottschling D.E, Cech T.R. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena // *Cell.* - 1982. - V. 31. - P. 147–157.

139. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S., The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme // *Cell*. - 1983. - V. 35. - P. 849–857.
140. Peebles C.L., Perlman P.S., Mecklenburg K.L., Petrillo M.L., Tabor J.H., Jarrell K.A., Cheng H.L. A self-splicing RNA excises an intron lariat // *Cell*. - 1986. - V. 44. - P. 213–23.
141. Hutchins C.J., Rathjen P.D., Forster A.C., Symons R.H. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid // *Nucleic Acids Res.* - 1986. - V. 14. - P. 3627–40.
142. Buzayan J.M., Gerlach W.L., Bruening G. Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA // *Nature*. - 1986. - V. 323. - P. 349–353.
143. Kuo M.Y., Sharmeen L., Dinter-Gottlieb G., Taylor J. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus // *J. Virol.* - 1988. - V. 62. - P. 4439–44.
144. Saville B.J., Collins R.A. A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in neurospora mitochondria // *Cell*. - 1990. - V. 61. - P. 685–696.
145. Winkler W.C., Nahvi A., Roth A., Collins J.A., Breaker R.R. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme // *Nature*. - 2004. - V. 428. - P. 281–286.
146. Roth A., Weinberg Z., Chen A., Kim P.B., Ames T.D., Breaker R.R. A widespread self-cleaving ribozyme class is revealed by bioinformatics // *Nat. Chem. Biol.* - 2014. - V. 10. - P. 56–60.
147. Weinberg Z., Kim P.B., Chen T.H., Li S., Harris K.A., Lünse C.E., Breaker R.R. New classes of self-cleaving ribozymes revealed by comparative genomics analysis // *Nat. Chem. Biol.* - 2015. - V. 11. - P. 606–610.
148. Forster A.C., Altman S. External guide sequences for an RNA enzyme // *Science*. - 1990. - V. 249. - P. 783–6.
149. Li Y., Guerrier-Takada C., Altman S. Targeted cleavage of mRNA in vitro by RNase P from *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1992. - V. 89. - P.185–9.

150. Zou H., Lee J., Umamoto S., Kilani A.F., Kim J., Trang P., Zhou T., Liu F. Engineered RNase P Ribozymes Are Efficient in Cleaving a Human Cytomegalovirus mRNA *in Vitro* and Are Effective in Inhibiting Viral Gene Expression and Growth in Human Cells // *J. Biol. Chem.* - 2003. - V. 278. - P. 37265–37274.
151. Szostak J.W. *In vitro* genetics // *Trends Biochem. Sci.* - 1992. - V. 17. - P. 89–93.
152. Motard J., Rouxel R., Paun A., von Messling V., Bisaillon M., Perreault J.-P. A Novel Ribozyme-Based Prophylaxis Inhibits Influenza A Virus Replication and Protects from Severe Disease // *PLoS One.* - 2011. - V. 6. - e27327.
153. Lainé S., Scarborough R.J., Lévesque D., Didierlaurent L., Soye K.J., Mougél M., Perreault J.-P., Gagnon A. *In vitro* and *in vivo* cleavage of HIV-1 RNA by new SOFA-HDV ribozymes and their potential to inhibit viral replication // *RNA Biol.* - 2011. - V. 8. - P. 343–53.
154. Ben Aissa M., April M.-C., Bergeron L.-J., Perreault J.-P., Levesque G. Silencing of Amyloid Precursor Protein Expression Using a New Engineered Delta Ribozyme // *Int. J. Alzheimers. Dis.* - 2012. - V. 2012. - P. 1–12.
155. Lu Y., Gu J., Jin D., Gao Y., Yuan M. Inhibition of telomerase activity by HDV ribozyme in cancers // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* - 2011. - V. 30. - 1.
156. Burnett J.C., Rossi J.J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects // *Chem. Biol.* - 2012. - V. 19. - P. 60–71.
157. Weng D.E., Usman N. Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor // *Curr. Oncol. Rep.* - 2001. - V. 3. - P. 141–6.
158. Kobayashi H., Gail Eckhardt S., Lockridge J.A., Rothenberg M.L., Sandler A.B., O'Bryant C.L., Cooper W., Holden S.N., Aitchison R.D., Usman N., Wolin M., Basche M.L., Safety and pharmacokinetic study of RPI.4610 (ANGIOZYME), an anti-VEGFR-1 ribozyme, in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 2005. - V. 56. - P. 329–336.

159. Wong-Staal F., Poeschla E.M., Looney D.J. A Controlled, Phase 1 Clinical Trial to Evaluate the Safety and Effects in HIV-1 Infected Humans of Autologous Lymphocytes Transduced with a Ribozyme that Cleaves HIV-1 RNA // *Hum. Gene Ther.* - 1998. - V. 9. - P. 2407–2425.
160. Amado R.G., Mitsuyasu R.T., Rosenblatt J.D., Ngok F.K., Bakker A., Cole S., Chorn N., Lin L.-S., Bristol G., Boyd M.P., MacPherson J.L., Fanning G.C., Todd A. V., Ely J.A., Zack J.A., Symonds G.P. Anti-Human Immunodeficiency Virus Hematopoietic Progenitor Cell-Delivered Ribozyme in a Phase I Study: Myeloid and Lymphoid Reconstitution in Human Immunodeficiency Virus Type-1–Infected Patients // *Hum. Gene Ther.* - 2004. - V. 15. - P. 251–262.
161. Mitsuyasu R.T., T.C. Merigan, A. Carr, J.A. Zack, M.A. Winters, C. Workman, M. Bloch, J. Lalezari, S. Becker, L. Thornton, B. Akil, H. Khanlou, R. Finlayson, R. McFarlane, D.E. Smith, R. Garsia, D. Ma, M. Law, J.M. Murray, C. von Kalle, J.A. Ely, S.M. Patino, A.E. Knop, P. Wong, A. V Todd, M. Haughton, C. Fuery, J.L. Macpherson, G.P. Symonds, L.A. Evans, S.M. Pond, D.A. Cooper, Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells // *Nat. Med.* - 2009. - V. 15. - P. 285–292.
162. Li M.-J., Kim J., Li S., Zaia J., Yee J.-K., Anderson J., Akkina R., Rossi J.J. Long-Term Inhibition of HIV-1 Infection in Primary Hematopoietic Cells by Lentiviral Vector Delivery of a Triple Combination of Anti-HIV shRNA, Anti-CCR5 Ribozyme, and a Nucleolar-Localizing TAR Decoy // *Mol. Ther.* - 2005. - V. 12. - P. 900–909.
163. Goodchild J. Hammerhead ribozymes for target validation // *Expert Opin. Ther. Targets.* - 2002. - V. 6. - P. 235–47.
164. Uhlenbeck O.C. A small catalytic oligoribonucleotide // *Nature.* - 1987. - V. 328. - P. 596–600.
165. Kore A.R., Vaish N.K., Kutzke U., Eckstein F. Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule // *Nucleic Acids Res.* - 1998. - V. 26. - P. 4116–20.
166. Hovig E., Mælandsmo G., Fodstad Ø., Mielewczyk S.S., Wolfe J., Goodchild J. Optimization of Hammerhead Ribozymes for the Cleavage of S100A4 (CAPL) mRNA // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* - 2001. - V. 11. - P. 67–75.

167. Citti L., Eckstein F., Capecchi B., Mariani L., Nevischi S., Poggi A., Rainaldi G., Transient Transfection of a Synthetic Hammerhead Ribozyme Targeted Against Human MGMT Gene to Cells in Culture Potentiates the Genotoxicity of the Alkylation Damage Induced by Mitozolomide // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* - 1999. - V. 9. - P. 125–133.
168. Hertel K.J., Pardi A., Uhlenbeck O.C., Koizumi M., Ohtsuka E., Uesugi S., Cedergren R., Eckstein F., Gerlach W.L., Hodgson R. Numbering system for the hammerhead // *Nucleic Acids Res.* - 1992. - V. 20. - P. 3252.
169. Little E., Lee A.S. Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter // *J. Biol. Chem.* - 1995. - V. 270. - P. 9526–34.
170. Kato Y., Kuwabara T., Warashina M., Toda H., Taira K. Relationships between the activities in vitro and in vivo of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 276. - P. 15378–85.
171. Kuwabara T., Warashina M., Koseki S., Sano M., Ohkawa J., Nakayama K., Taira K. Significantly higher activity of a cytoplasmic hammerhead ribozyme than a corresponding nuclear counterpart: engineered tRNAs with an extended 3' end can be exported efficiently and specifically to the cytoplasm in mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - V. 29. - P. 2780–8.
172. Cotten M., Birnstiel M.L. Ribozyme mediated destruction of RNA in vivo // *EMBO J.* - 1989. - V. 8. - P. 3861–6.
173. Scarborough R.J., Gatignol A. HIV and Ribozymes // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2015. - P. 97–116.
174. Morrow P.K., Murthy R.K., Ensor J.D., Gordon G.S., Margolin K.A., Elias A.D., Urba W.J., Weng D.E., Rugo H.S., Hortobagyi G.N. An open-label, phase 2 trial of RPI.4610 (angiozyme) in the treatment of metastatic breast cancer // *Cancer.* - 2012. - V. 118. - P. 4098–4104.
175. Zeller S.J., Kumar P. RNA-based gene therapy for the treatment and prevention of HIV: from bench to bedside // *Yale J. Biol. Med.* - 2011. - V. 84. - P. 301–9.

176. Rusk N. Prokaryotic RNAi // *Nat. Methods.* - 2012. - V. 9. - P. 220–1.
177. Breaker R.R., Joyce G.F. A DNA enzyme that cleaves RNA // *Chem. Biol.* - 1994. - V. 1. - P. 223–9.
178. Santoro S.W., Joyce G.F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1997. - V. 94. - P. 4262–6.
179. Zhou W., Ding J., Liu J. Theranostic DNazymes // *Theranostics.* - 2017. - V. 7. - P. 1010–1025.
180. Fokina A.A., Stetsenko D.A., François J.-C. DNA enzymes as potential therapeutics: towards clinical application of 10-23 DNazymes // *Expert Opin. Biol. Ther.* - 2015. - V. 15. - P. 689–711.
181. Sidorov A. V, Grasby J.A., Williams D.M. Sequence-specific cleavage of RNA in the absence of divalent metal ions by a DNzyme incorporating imidazolyl and amino functionalities // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - V. 32. - P. 1591–601.
182. Zhu J., Li Z., Wang Q., Liu Y., He J. The contribution of adenines in the catalytic core of 10-23 DNzyme improved by the 6-amino group modifications // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2016. - V. 26. - P. 4462–4465.
183. Rong W., Xu L., Liu Y., Yu J., Zhou Y., Liu K., He J. 8–17 DNzyme modified with purine analogs in its catalytic core: The conservation of the five-membered moieties of purine residues // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2012. - V. 22. - P. 4238–4241.
184. Cho E.-A., Moloney F.J., Cai H., Au-Yeung A., China C., Scolyer R.A., Yosufi B., Raftery M.J., Deng J.Z., Morton S.W., Hammond P.T., Arkenau H.-T., Damian D.L., Francis D.J., Chesterman C.N., Barnetson R.S.C., Halliday G.M., Khachigian L.M. Safety and tolerability of an intratumorally injected DNzyme, Dz13, in patients with nodular basal-cell carcinoma: a phase 1 first-in-human trial (DISCOVER) // *Lancet.* - 2013. - V. 381. - P. 1835–1843.
185. Cao Y., Yang L., Jiang W., Wang X., Liao W., Tan G., Liao Y., Qiu Y., Feng D., Tang F., Hou B.L., Zhang L., Fu J., He F., Liu X., Jiang W., Yang T., Sun L.-Q. Therapeutic Evaluation of

Epstein-Barr Virus-encoded Latent Membrane Protein-1 Targeted DNase for Treating of Nasopharyngeal Carcinomas // *Mol. Ther.* - 2014. - V. 22. - P.371–377.

186. Turowska A., Kuhlmann J., Müller A., Renz J., Bille J., Renz H., Garn H. Safety profile and pharmacokinetics of SB010, an inhaled GATA-3-specific DNase, in phase I clinical trials in healthy and asthmatic subject // *European respiratory journal.* - 2013.

187. Terns M.P. CRISPR-Based Technologies: Impact of RNA-Targeting Systems // *Mol. Cell.* - 2018. - V. 72. - P. 404–412.

188. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // *J. Bacteriol.* - 1987. - V. 169. - P. 5429–33.

189. Mojica F.J., Juez G., Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites // *Mol. Microbiol.* - 1993. - V. 9. - P. 613–21.

190. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Wolf Y.I., Yakunin A.F., van der Oost J., Koonin E.V., Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2011. - V. 9. - P. 467–77.

191. Mojica F.J.M., C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, E. Soria, Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements // *J. Mol. Evol.* - 2005. - V. 60. - P. 174–182.

192. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science.* - 2007. - V. 315. - P. 1709–12.

193. Liu T.Y., Iavarone A.T., Doudna J.A. RNA and DNA Targeting by a Reconstituted *Thermus thermophilus* Type III-A CRISPR-Cas System // *PLoS One.* - 2017. - V. 12. - e0170552.

194. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns

R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E. V. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2015. - V. 13. - P. 722–736.

195. Hale C.R., Zhao P., Olson S., Duff M.O., Graveley B.R., Wells L., Terns R.M., Terns M.P. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex // *Cell.* - 2009. - V. 139. - P. 945–956.

196. Hille F., Richter H., Wong S.P., Bratovič M., Ressel S., Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward // *Cell.* - 2018. - V. 172. - P. 1239–1259.

197. Zebec Z., Manica A., Zhang J., White M.F., Schleper C. CRISPR-mediated targeted mRNA degradation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - V. 42. - P. 5280–5288.

198. Foster K., Kalter J., Woodside W., Terns R.M., Terns M.P. The ribonuclease activity of Csm6 is required for anti-plasmid immunity by Type III-A CRISPR-Cas systems // *RNA Biol.* - 2019. - V. 16. - P. 449–460.

199. Kazlauskienė M., Tamulaitis G., Kostiuk G., Venclovas Č., Siksnys V. Spatiotemporal Control of Type III-A CRISPR-Cas Immunity: Coupling DNA Degradation with the Target RNA Recognition // *Mol. Cell.* - 2016. - V. 62. - P. 295–306.

200. Dugar G., Leenay R.T., Eisenbart S.K., Bischler T., Aul B.U., Beisel C.L., Sharma C.M. CRISPR RNA-Dependent Binding and Cleavage of Endogenous RNAs by the *Campylobacter jejuni* Cas9 // *Mol. Cell.* - 2018. - V. 69. - P. 893–905.

201. Nelles D.A., Fang M.Y., O’Connell M.R., Xu J.L., Markmiller S.J., Doudna J.A., Yeo G.W. Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9 // *Cell.* - 2016. - V. 165. - P. 488–496.

202. Batra R., Nelles D.A., Pirie E., Blue S.M., Marina R.J., Wang H., Chaim I.A., Thomas J.D., Zhang N., Nguyen V., Aigner S., Markmiller S., Xia G., Corbett K.D., Swanson M.S., Yeo G.W. Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9 // *Cell.* - 2017. - V. 170. - P. 899–912.

203. Liu Y., Chen Z., He A., Zhan Y., Li J., Liu L., Wu H., Zhuang C., Lin J., Zhang Q., Huang W. Targeting cellular mRNAs translation by CRISPR-Cas9 // *Sci. Rep.* - 2016. - V. 6. - P. 29652.
204. Price A.A., Sampson T.R., Ratner H.K., Grakoui A., Weiss D.S. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2015. - V. 112. - P. 6164–6169.
205. O’Connell M.R. Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR–Cas Systems // *J. Mol. Biol.* - 2019. - V. 431. - P. 66–87.
206. Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S., Wolf Y.I., Gootenberg J.S., Semenova E., Minakhin L., Joung J., Konermann S., Severinov K., Zhang F., Koonin E.V. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems // *Mol. Cell.* - 2015. - V. 60. - P. 385–397.
207. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B.T., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E. V, Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science.* - 2016. - V. 353.
208. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Essletzbichler P., Han S., Joung J., Belanto J.J., Verdine V., Cox D.B.T., Kellner M.J., Regev A., Lander E.S., Voytas D.F., Ting A.Y., Zhang F. RNA targeting with CRISPR–Cas13 // *Nature.* - 2017. - V. 550. - P. 280–284.
209. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. RNA editing with CRISPR-Cas13 // *Science.* - 2017. - V. 358. - P. 1019–1027.
210. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N.M., Freije C.A., Myhrvold C., Bhattacharyya R.P., Livny J., Regev A., Koonin E.V., Hung D.T., Sabeti P.C., Collins J.J., Zhang F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // *Science.* - 2017. - V. 356. - P. 438–442.
211. Konermann S., Lotfy P., Brideau N.J., Oki J., Shokhirev M.N., Hsu P.D. Transcriptome Engineering with RNA-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors // *Cell.* - 2018. - V. 173. - P. 665-676.

212. Niittymäki T., Lönnberg H. Artificial ribonucleases // *Org. Biomol. Chem.* - 2006. - V. 4. - P. 15–25.
213. Usher D.A., McHale A.H. Nonenzymic joining of oligoadenylates on a polyuridylic acid template // *Science.* - 1976. - V. 192. - P. 53–4.
214. Emilsson G.M., Nakamura S., Roth A., Breaker R.R. Ribozyme speed limits // *RNA.* - 2003. - V. 9. - P. 907–18.
215. Butzow J.J., Eichhorn G.L. Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds. IV. Degradation of polyribonucleotides by zinc and other divalent metal ions // *Biopolymers.* - 1965. - V. 3. - P. 95–107.
216. Eichhorn G.L., Butzow J.J. Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds. III. Degradation of polyribonucleotides by lanthanum ions // *Biopolymers.* - 1965. - V. 3. - P. 79–94.
217. Matsumura K., Endo M., Komiyama M. Lanthanide complex–oligo-DNA hybrid for sequence-selective hydrolysis of RNA // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* - 1994. - V. 0. - P. 2019–2020.
218. Magda D., Crofts S., Lin A., Miles D., Wright M., Sessler J.L. Synthesis and Kinetic Properties of Ribozyme Analogues Prepared Using Phosphoramidite Derivatives of Dysprosium(III) Texaphyrin // *J. Am. Chem. Soc.* - 1997. - V. 119. - P. 2293–2294
219. Magda D., Wright M., Crofts S., Lin A., Sessler J.L. Metal Complex Conjugates of Antisense DNA Which Display Ribozyme-Like Activity // *J. Am. Chem. Soc.* - 1997. - V. 119. - P. 6947–6948
220. Hall J., Hüsken D., Häner R. Towards artificial ribonucleases: the sequence-specific cleavage of RNA in a duplex // *Nucleic Acids Res.* - 1996. - V. 24. - P. 3522–3526.
221. Haner R., Hall J., Pfutzer A., Husken D. Development of artificial ribonucleases // *Pure & Appl. Chem.* - 1998. - V. 70. - P. 111–116.

222. Kuzuya A., Machida K., Sasayama T., Shi Y., Mizoguchi R., Komiyama M. Lanthanide ions as versatile catalyst in biochemistry: Efficient site-selective scission of RNA by free lanthanide ions // *J. Alloys Compd.* - 2006. - V. 408–412. - P. 396–399.
223. Bashkin J.K., Frolova E.I., Sampath U. Sequence-Specific Cleavage of HIV mRNA by a Ribozyme Mimic // *J. Am. Chem. Soc.* - 1994. - V. 116. - P. 5981–5982.
224. Trawick B.N., Daniher A.T., Bashkin J.K. Inorganic Mimics of Ribonucleases and Ribozymes: From Random Cleavage to Sequence-Specific Chemistry to Catalytic Antisense Drugs // *Chem. Rev.* - 1998. - V. 98. - P. 939–960.
225. Putnam W.C., Daniher A.T., Trawick B.N., Bashkin J.K. Efficient new ribozyme mimics: direct mapping of molecular design principles from small molecules to macromolecular, biomimetic catalysts // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - V. 29. - P. 2199–204.
226. Sakamoto S., Tamura T., Furukawa T., Komatsu Y., Ohtsuka E., Kitamura M., Inoue H. Highly efficient catalytic RNA cleavage by the cooperative action of two Cu(II) complexes embodied within an antisense oligonucleotide // *Nucleic Acids Res.* - 2003. - V. 31. - P. 1416–25.
227. Putnam W.C., Bashkin J.K. De novo synthesis of artificial ribonucleases with benign metal catalysts // *Chem. Commun.* - 2000. - V. 0. - P. 767–768.
228. Aström H., Williams N.H., Strömberg R. Oligonucleotide based artificial nuclease (OBAN) systems. Bulge size dependence and positioning of catalytic group in cleavage of RNA-bulges // *Org. Biomol. Chem.* - 2003. - V. 1. - P. 1461–5.
229. Aström H., Strömberg R. Synthesis of new OBAN's and further studies on positioning of the catalytic group // *Org. Biomol. Chem.* - 2004. - V. 2. - P. 1901–7.
230. Whitney A., Gavory G., Balasubramanian S. Site-specific cleavage of human telomerase RNA using PNA-neocuproine.Zn(II) derivatives // *Chem. Commun. (Camb).* - 2003. - V. 1. - P. 36–7.
231. Hovinen J., Guzaev A., Azhayeva E., Azhayev A., Lonnberg H. Imidazole Tethered

Oligodeoxyribonucleotides: Synthesis and RNA Cleaving Activity // *J. Org. Chem.* - 1995. - V. 60. - P. 2205–2209.

232. Niittymäki T., Kaukinen U., Virta P., Mikkola S., Lönnberg H. Preparation of azacrown-functionalized 2'-O-methyl oligoribonucleotides, potential artificial RNases // *Bioconjug. Chem.* - 2004. - V. 15. - P. 174–84.

233. Matsuda S., Ishikubo A., Kuzuya A., Yashiro M., Komiyama M. Conjugates of a Dinuclear Zinc(II) Complex and DNA Oligomers as Novel Sequence-Selective Artificial Ribonucleases // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 1998. - V. 37. - P. 3284–3286.

234. Morrow J.R., Kolasa K.A., Amin S., Chin K.O.A. Metal Ion Macrocyclic Complexes as Artificial Ribonucleases // *Advances in Chemistry.* - 1996. - V. 246. - P. 431–447.

235. Beloglazova N.G., Fabani M.M., Zenkova M.A., Bichenkova E.V., Polushin N.N., Sil'nikov V.V., Douglas K.T., Vlassov V.V. Sequence-specific artificial ribonucleases. I. Bis-imidazole-containing oligonucleotide conjugates prepared using precursor-based strategy // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - V. 32. - P. 3887–97.

236. Nakano S., Uotani Y., Uenishi K., Fujii M., Sugimoto N., Site-Selective RNA Cleavage by DNA Bearing a Base Pair-Mimic Nucleoside // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005. - V. 1272. - P. 518-519

237. Niittymäki T., Virta P., Ketomäki K., Lönnberg H. Di(azacrown) Conjugates of 2'-O-Methyl Oligoribonucleotides as Sequence-Selective Artificial Ribonucleases // *Bioconjug Chem.* - 2007. - V.18. - P. 1583-92.

238. Kuzuya A., Mizoguchi R., Komiyama M. Site-selective artificial ribonuclease using pinpoint RNA activation // *Nucleic Acids Res. Suppl.* - 2001. - P. 131–2.

239. Scheffer U., Strick A., Ludwig V., Peter S., Kalden E., Gö M.W. Metal-Free Catalysts for the Hydrolysis of RNA Derived from Guanidines, 2-Aminopyridines, and 2-Aminobenzimidazoles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005. - V. 1277. - P. 2211-2217

240. Komiyama M., Inokawa T., Shiiba T., Takeda N., Yoshinari K., Yashiro M. Molecular design of artificial hydrolytic nucleases and ribonucleases // *Nucleic Acids Symp. Ser.* - 1993. - P.

197–8.

241. Verheijen J.C., Deiman B.A., Yeheskiely E., van Der Marel G.A., van Boom J.H., Efficient Hydrolysis of RNA by a PNA - Diethylenetriamine Adduct // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2000. - V. 39. - P. - 369–372.

242. Riguet E., Tripathi S., Chaubey B., Désiré J., Pandey V.N., Décout J.-L. A peptide nucleic acid-neamine conjugate that targets and cleaves HIV-1 TAR RNA inhibits viral replication // *J. Med. Chem.* - 2004. - V. 47. - P. 4806–9.

243. Scheffer U., Strick A., Ludwig V., Peter S., Kalden E., Göbel M.W. Metal-free catalysts for the hydrolysis of RNA derived from guanidines, 2-aminopyridines, and 2-aminobenzimidazoles // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005. - V. 127. - P. 2211–7.

244. 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. - V. 128. - P. 8063–7.

245. Dogandzhiyski P., Ghidini A., Danneberg F., Strömberg R., Göbel M.W. Studies on Tris(2-aminobenzimidazole)-PNA Based Artificial Nucleases: A Comparison of Two Analytical Techniques // *Bioconjug. Chem.* - 2015. - V. 26. - P. 2514–9.

246. 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 ribonuc1. F. Danneberg, A. Ghidini, P. Dogandzhiyski, E. Kalden, R. Strömberg, M.W. Göbel, Sequence-specific RNA cleavage by PNA conjugates of the metal-free artificial ribonuc // *Beilstein J. Org. Chem.* - 2015. - V. 11. - P. 493–8.

247. Vlassov V.V., Abramova T., Godovikova T., Giege R., Silnikov V. Sequence-Specific Cleavage of Yeast tRNA^{Phe} with Oligonucleotides Conjugated to a Diimidazole Construct // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* - 1997. - V. 7. - P. 39–42.

248. Reynolds M.A., Beck T.A., Say P.B., Schwartz D.A., Dwyer B.P., Daily W.J., Vaghefi M.M., Metzler M.D., Klem R.E., Arnold L.J. Antisense oligonucleotide containing an internal, non-nucleotide-based linker promote site-specific cleavage of RNA // *Nucleic Acids Res.* - 1996. - V. 24. -

P. 760–65.

249. Ushijima K., Gouzu H., Hosono K., Shirakawa M., Kagosima K., Takai K., Takaku H. Site-specific cleavage of tRNA by imidazole and/or primary amine groups bound at the 5'-end of oligodeoxyribonucleotides // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1998. - V. 1379. - P. 217–23.

250. 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. - V. 2011.

251. Barbier B., Brack A. Search for catalytic properties of simple polypeptides // *Orig. Life Evol. Biosph.* - 1987. - V. 17. - P. 381–390.

252. Brack A., Barbier B. Chemical activity of simple basic peptides // *Orig. Life Evol. Biosph.* - 1990. - V. 20. - P. 139–144.

253. 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. - V. 23. - P. 497–504.

254. 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. - V. 35. - P. 2356–67.

255. 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. - V. 32. - P. 1928–36.

256. 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. - V. 122. - P. 163–178.

257. Zellmann F., Thomas L., Scheffer U., Hartmann R., Göbel M. Site-Specific Cleavage of RNAs Derived from the PIM1 3'-UTR by a Metal-Free Artificial Ribonuclease // *Molecules.* - 2019. -

V. 24. - P. 807.

258. 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. - V. 7. - P. 2490–9.

259. 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. - V. 8. - P. 14990.

260. Soukup G.A., Breaker R.R. Relationship between internucleotide linkage geometry and the stability of RNA // *RNA.* - 1999. - V. 5. - P. 1308–25.

261. Westheimer F.H. Pseudo-rotation in the hydrolysis of phosphate esters // *Acc. Chem. Res.* - 1968. - V. 1. - P. 70–78.

262. Oivanen M., Kuusela S., Lönnberg H. Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the Phosphodiester Bonds of RNA by Brønsted Acids and Bases // *Chem. Rev.* - 1998. - V. 98. - P. 961–990.

263. Sreedhara A., Cowan J.A. Structural and catalytic roles for divalent magnesium in nucleic acid biochemistry // *Biometals.* - 2002. - V. 15. - P. 211–23.

264. Li Y., Breaker R.R. Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group // *J. Am. Chem. Soc.* - 1999. - V. 121. - P. 5364–5372.

265. Raines R.T. Ribonuclease A // *Chem. Rev.* - 1998. - V. 98. - P. 1045–1066.

266. Kosonen M., Lönnberg H. General and specific acid/base catalysis of the hydrolysis and interconversion of ribonucleoside 2'- and 3'-phosphotriesters: kinetics and mechanisms of the reactions of 5'-O-pivaloyluridine 2'- and 3'-dimethylphosphates // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* - 1995. - V. 0. - P. 1203–1209.

267. Almer H., Strömberg R. Base Catalysis and Leaving Group Dependence in Intramolecular Alcoholysis of Uridine 3'-(Aryl phosphorothioate)s // *J. Am. Chem. Soc.* -1996. - V. 118. - P. 7921-7928
268. Lim C., Karplus M. Nonexistence of dianionic pentacovalent intermediates in an ab initio study of the base-catalyzed hydrolysis of ethylene phosphate // *J. Am. Chem. Soc.* - 1990. - V. 112. - P. 5872-5873.
269. Perreault D.M., Anslyn E. V. Unifying the Current Data on the Mechanism of Cleavage-Transesterification of RNA // *Angew. Chemie Int. Ed. English.* - 1997. - V. 36. - P. 432-450.
270. 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. - V. 33. - P. 1201-12.
271. Kovalev N.A., Medvedeva D.A., Zenkova M.A., Vlassov V.V. Cleavage of RNA by an amphiphilic compound lacking traditional catalytic groups // *Bioorg. Chem.* - 2008. - V. 36. - P. 33-45.
272. Lutay A.V., Zenkova M.A., Vlassov V.V. Nonenzymatic recombination of RNA: possible mechanism for the formation of novel sequences // *Chem. Biodivers.* - 2007. - V. 4. - P. 762-7.
273. Dolinnaya N.G., Sokolova N.I., Ashirbekova D.T., Shabarova Z.A. The use of BrCN for assembling modified DNA duplexes and DNA-RNA hybrids; comparison with water-soluble carbodiimide // *Nucleic Acids Res.* - 1991. - V. 19. - P. 3067-72.
274. Lutay A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Vlasov V.V. Nonenzymatic template-dependent ligation of 2',3'-cyclic phosphate-containing oligonucleotides catalyzed by metal ions // *Dokl. Biochem. Biophys.* - 2005. - V. 401. - P. 163-6.
275. Rohatgi R., Bartel D.P., Szostak J.W. Kinetic and mechanistic analysis of nonenzymatic, template-directed oligoribonucleotide ligation // *J. Am. Chem. Soc.* - 1996. - V. 118. - P. 3332-9.

276. Lutay A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Vlassov V.V. The nonenzymatic template-directed ligation of oligonucleotides // *Biogeosciences*. - 2006. - V. 3. - P. 243–249.
277. Ekland E.H., Szostak J.W., Bartel D.P. Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences // *Science*. - 1995. - V. 269. - P. 364–70.
278. Bartel D.P., Szostak J.W. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences see comment // *Science*. - 1993. - V. 261. - P. 1411–8.
279. Rohatgi R., Bartel D.P., Szostak J.W. Nonenzymatic, template-directed ligation of oligoribonucleotides is highly regioselective for the formation of 3'-5' phosphodiester bonds // *J. Am. Chem. Soc.* - 1996. - V. 118. - P. 3340–4.
280. Pino S., Costanzo G., Giorgi A., Šponer J., Šponer J., Mauro E. Ribozyme Activity of RNA Nonenzymatically Polymerized from 3',5'-Cyclic GMP // *Entropy*. - 2013. - V. 15. - P. 5362–5383.
281. Riley C.A., Lehman N. Generalized RNA-directed recombination of RNA // *Chem. Biol.* - 2003. - V. 10. - P. 1233–43.
282. Draper W.E., Hayden E.J., Lehman N. Mechanisms of covalent self-assembly of the *Azoarcus* ribozyme from four fragment oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* - 2008. - V. 36. - P. 520–31.
283. Serikov R., Petyuk V., Vorobijev Y., Koval V., Fedorova O., Vlassov V., Zenkova M. Mechanism of Antisense Oligonucleotide Interaction with Natural RNAs // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2011. - V. 29. - P. 27–50.
284. Kierzek R. Hydrolysis of oligoribonucleotides: influence of sequence and length // *Nucleic Acids Res.* - 1992. - V. 20. - P. 5073–7.
285. Yan B.X., Sun Y.Q. Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites // *J. Biol. Chem.* - 1997. - V. 272. - P. 3190–4.
286. Bartlett G.J., Porter C.T., Borkakoti N., Thornton J.M. Analysis of catalytic residues in

enzyme active sites // J. Mol. Biol. - 2002. - V. 324. - P. 105–21.

287. Okoniewska M., Tanaka T., Yada R.Y. The pepsin residue glycine-76 contributes to active-site loop flexibility and participates in catalysis // Biochem. J. - 2000. - V. 349. - P. 169–77.

288. Tiwari M.K., Singh R.K., Singh R., Jeya M., Zhao H., Lee J.-K. Role of conserved glycine in zinc-dependent medium chain dehydrogenase/reductase superfamily // J. Biol. Chem. - 2012. - V. 287. - P. 19429–39.

289. Beloglazova N.G., Sil'nikov V.N., Zenkova M.A., Vlassov V. V. Cleavage of yeast tRNAPhe with complementary oligonucleotide conjugated to a small ribonuclease mimic // FEBS Lett. - 2000. - V. 481. - P. 277–80.

290. Mironova N.L., Pyshnyi D.V., Ivanova E.M., Zarytova V.F., Zenkova M.A., Gross H.J., Vlassov V.V. Sequence-specific RNA cleavage by oligonucleotide-peptide conjugates // Russ. Chem. Bull. - 2002. - V. 51. - P. 1177–1186.

291. Kuznetsova I., Tuzikov F., Tuzikova N., Tamkovich N., Zenkova M., Vlassov V. The role of hydrophobic interactions in catalysis of RNA cleavage by 1,4-diazabicyclo2.2.2.-octane based artificial ribonucleases // Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids. - 2004. - V. 23. - P. 907–13.

292. Shi H., Moore P.B. The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited // RNA. - 2000. - V. 6. - P. 1091–105.

293. Krieger E., Koraimann G., Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field // Proteins. - 2002. - V. 47. - P. 393–402.

294. Corona-Martínez D.O, Taran O., Yatsimirsky A.K. Mechanism of general acid-base catalysis in transesterification of an RNA model phosphodiester studied with strongly basic catalysts // Org. Biomol. Chem. - 2010. - V. 8. - P. 873–80.

295. 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. - V. 78. - P. 7259–7263.

296. Rushizky G.W., Knight C.A., Sober H.A. Studies on the preferential specificity of pancreatic ribonuclease as deduced from partial digests // *J. Biol. Chem.* - 1961. - V. 236. - P. 2732–7.
297. McDowell S.E., Jun J.M., Walter N.G. Long-range tertiary interactions in single hammerhead ribozymes bias motional sampling toward catalytically active conformations // *RNA.* - 2010. - V. 16. - P. 2414–26.
298. Martick M., Scott W.G. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis // *Cell.* -2006. - V. 126. - P. 309–20.