

*На правах рукописи*

**Дубовиченко Михаил Вадимович**

**Многофункциональные терапевтические олигонуклеотиды для улучшения  
эффективности и селективности расщепления РНК**

1.5.4. Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Химико-биологическом кластере федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

Научный руководитель: **Колпащиков Дмитрий Михайлович**  
кандидат химических наук, профессор, руководитель  
лаборатории ДНК-наномашин для биомедицинского  
применения Университета Центральной Флориды, США

Официальные оппоненты: **Коршун Владимир Аркадьевич**  
доктор биологических наук, главный научный сотрудник  
лаборатории молекулярного дизайна ФГБУН Институт  
биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова

**Манухов Илья Владимирович**  
доктор биологических наук, заведующий лабораторией  
молекулярной генетики ФГАОУ ВО «Московский физико-  
технический институт (государственный университет)»  
(МФТИ)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки, Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины Сибирского Отделения Российской академии наук  
(ИХБФМ СО РАН)

Защита состоится 30 апреля 2025 г. на заседании диссертационного совета ПДС 0300.025 при  
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г.  
Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ  
ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» 117198, г. Москва, ул.  
Миклухо-Маклая, д. 6.

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу:  
<https://www.rudn.ru/science/dissovet> и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК  
при Минобрнауки России: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета ПДС 0300.025  
доктор биологических наук, профессор

Лукашева Елена Васильевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Под терапевтическими олигонуклеотидами подразумевается класс молекулярных инструментов на основе коротких олигонуклеотидов, предназначенных для искусственного регулирования экспрессии целевых генов на уровне пре-мРНК и мРНК с последующим ингибированием трансляции целевого белка. К таким молекулярным агентам относят антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), короткие интерферирующие РНК (киРНК), комплексы гРНК-CRISPR/Cas и РНК-расщепляющие ДНКзимы (Дз). Все названные подходы объединяет схожий механизм действия, при котором происходит комплементарное распознавание целевой мРНК и последующая её деградация через расщепление фосфодиэфирных связей внутри неё. Чаще всего такие молекулярные инструменты используются в исследованиях по искусственному нарушению экспрессии генов, белки которых участвуют в патологических процессах. Терапевтические олигонуклеотиды часто также называют терапевтическими нуклеиновыми кислотами (ТНК) или агентами олигонуклеотидной генной терапии (от англ. oligonucleotide gene therapy (OGT) agents).

Несмотря на то, что начало своего развития технология ТНК берет с конца 1970-х годов, к настоящему времени одобрено лишь небольшое число таких лекарственных агентов ввиду их низкой эффективности. Низкая эффективность обусловлена рядом факторов, тремя наиболее значимыми из которых являются: сложность внутриклеточной доставки, низкое сродство к участкам РНК, сложенным во вторичную структуру, и низкая специфичность комплементарного связывания с ней. Эта работа направлена на поиск фундаментального решения последних двух проблем.

**Степень разработанности темы исследования.** Для решения проблемы аффинности и специфичности ТНК широко используются специально разработанные электронные ресурсы по типу GeneScript, OptiRNAi, BLOCK-iT, siRNA-Finder, PFRED и др. Данные программы используются для расчета пространственной организации и термодинамических параметров как у разрабатываемых ТНК, так и у целевой РНК. Однако, в настоящее время подобные программы не способны предсказать вторичные структуры длинных мРНК, и вместе с тем часто возникают ситуации, когда необходимо нацеливать короткие ТНК на участки РНК со сложными структурами. Для повышения аффинности к таким структурам короткие олигонуклеотиды модифицируют путем их удлинения и/или внедрения в их последовательности модификаций по типу 2'-ОМе (2'-оксиметил) и/или LNA (от англ. Locked Nucleic Acid - замкнутые нуклеиновые кислоты). С одной стороны, за счёт этого аффинность действительно увеличивается. Однако, с другой стороны, также увеличивается и толерантность к неспецифическим регионам РНК при связывании с ней, что, в свою очередь, уменьшает специфичность действия и приводит к соответствующим побочным эффектам.

Таким образом, при дизайне коротких олигонуклеотидов возникает так называемая дилемма аффинности и специфичности, при которой высоко специфические ТНК-агенты имеют пониженную аффинность к РНК и, наоборот, при высокой аффинности их специфичность будет снижена. Способом решения этой дилеммы является использование нанотехнологических многофункциональных конструкций на основе коротких олигонуклеотидов с несколькими участками связывания.

В данной работе рассмотрены ранее неизвестные мультивалентные (в данном случае, бивалентные) ДНК-конструкции на основе Дз и АСО, и проведено систематическое исследование аллостерических (маркер-активируемых) ДНК-конструкций на основе Дз с дополнительными РНК-связывающими доменами. Оба вида ДНК-конструкций демонстрируют многофункциональность благодаря своим уникальным структурным характеристикам и способностям к взаимодействию с РНК. Мультивалентные конструкции имеют несколько «валентных» РНК-расщепляющих доменов, которые одновременно выполняют функции специфического связывания и расщепления нескольких участков одной сложной РНК. С другой стороны, аллостерические ДНК-конструкции, такие как бинарные Дз (БинДз) и «ДНК-машины» (БинДМ) – последние в своей структуре имеют дополнительные РНК-связывающие домены, выполняющие функцию облегчения связывания со сложной РНК –, также являются многофункциональными. Их особая характеристика заключается в зависимости выполнения функций связывания и расщепления РНК от присутствия эффектора — генетического маркера, активирующего функциональное состояние конструкций, что существенно повышает специфичность их действия и создает уникальные возможности для будущих применений в сложных клеточных системах.

**Цель работы** – добиться повышения эффективности и специфичности расщепления РНК Дз и АСО агентами путем разработки на их основе многофункциональных бивалентных и маркер-активируемых ДНК-конструкций.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать бивалентные конструкции на основе Дз (БивДз), нацеленные на расщепление РНК-фрагмента со стабильной вторичной структурой (РНК-58). Отобрать варианты БивДз с длинами Дз-связывающих и РНК-связывающих доменов, обеспечивающих наиболее высокую расщепляющую активность.
2. Изучить влияние степени ассоциации двух Дз субъединиц в составе БивДз на эффективность и специфичность расщепления РНК.
3. Разработать бивалентные АСО (БивАСО) и оценить их эффективность в расщеплении РНК-фрагмента со стабильной вторичной структурой. Оценить зависимость эффективности и

селективности РНК-расщепляющего действия от размеров и расположения одиночных АСО в составе БивАСО.

4. Разработать маркер-активируемые конструкции на основе Дз с двумя и с четырьмя РНК-связывающими доменами (БинДз и БинДМ). Оценить влияние количества РНК-связывающих доменов в конструкциях БинДз и БинДМ на эффективность расщепления различных РНК-фрагментов, отличающихся между собой стабильностью вторичной структуры.
5. Оценить специфичность РНК-расщепляющего действия выявленных оптимальных конструкций БинДз и БинДМ.

**Научная новизна.** Впервые предложено использование мультивалентных ДНК-конструкций на основе Дз и АСО, а также аллостерических конструкций на основе Дз с несколькими РНК-связывающими доменами для эффективного расщепления участков РНК со сложной вторичной структурой; систематически использованы РНК мишени, сложенные в стабильные вторичные структуры для характеристики связывания РНК-расщепляющих агентов на основе Дз и АСО; оценены влияния чисел каталитических ядер в составе БивДз, а также наличия дополнительных РНК-связывающих доменов в БивДз и БинДМ на увеличение числа оборотов расщепления РНК.

Изучены селективность связывания и РНК-расщепляющего действия для БивДз, БивАСО, БинДз и БинДМ. Предложен контроль селективности БивДз за счет изменения степени ассоциации двух субъединиц.

**Теоретическая и практическая значимость.** В диссертационной работе предлагается решение дилеммы аффинности/специфичности путем использования многокомпонентных РНК-расщепляющих агентов. Заложены основы изучения кинетики расщепления структурированных РНК с помощью многокомпонентных конструкций. Прделанная работа является начальным этапом подготовки технологий БивДз, БивАСО, БинДз и БинДМ к использованию их в условиях *in vivo* для подавления специфических РНК мишеней, что может быть использовано как в лабораторной исследовательской практике, так и в разработке методов терапии генетических, вирусных и онкологических заболеваний.

**Методология и методы исследования.** Основные методы исследования включали вертикальный полиакриламидный (ПААГ) гель-электрофорез для разделения продуктов расщепления РНК-мишени от исходной РНК, программы расчета концентраций исходной РНК и продуктов расщепления по изображениям ПААГ, а также комбинированный подход анализа химической кинетики и компьютерного анализа пространственной структуры и свойств олигонуклеотидов.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Конструкции БивДз каталитически расщепляют специфическую РНК со стабильной структурой со значительно большей эффективностью по сравнению с простыми Дз традиционного дизайна, демонстрируя многократно большую скорость расщепления и число каталитических оборотов как из-за более высокой аффинности, обеспечиваемое множеством РНК-связывающих доменов, так и за счет наличия большего числа каталитических ядер.
2. У конструкций БивДз с высокой РНК-расщепляющей активностью можно повысить специфичность распознавания однонуклеотидных замен путем уменьшения стабильности связывания двух Дз доменов друг с другом в составе бивалентной конструкции.
3. Конструкции БивАСО могут эффективно и селективно стимулировать РНКазы-Н-опосредованное расщепление целевой РНК, если оба домена АСО короткие и комплементарно связываются с участками РНК, фланкирующими вторичную структуру.
4. Аллостерические конструкции БинДз демонстрируют расщепление РНК лишь в присутствии специфической последовательности – активатора (генетического маркера), а добавление двух дополнительных РНК-связывающих рук (БинДМ) может давать прирост расщепления РНК со стабильной вторичной структурой.
5. Оптимизированный БинДМ, имеющий четыре РНК-связывающих домена, может обладать одновременно большей эффективностью и селективностью расщепления РНК по сравнению с конструкциями БинДз, имеющих два РНК-связывающих домена.

**Апробация исследования.** Работа выполнялась в рамках проекта № 922017 “Передовые технологии на основе нуклеиновых кислот в генной терапии рака”, поддержанного программой стратегии развития Университета ИТМО “Приоритет 2030”. Проект также был поддержан Комитетом по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга в рамках Конкурса грантов для аспирантов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в 2022 году.

Результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международная научная конференция молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в области молекулярной биологии, биохимии, биотехнологии» (Алма-Ата, Казахстан, 2023); 65-я Всероссийская научная конференция МФТИ (раздел ФБМФ - Секция клеточной и молекулярной биологии) (Москва, РФ, 2023); Международная конференция “2nd International Electronic Conference on Biomolecules: Biomacromolecules and the Modern World Challenges” (2022); IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков “OpenBio 2022” (Кольцово, РФ, 2022); XI Конгресс молодых ученых (КМУ) ИТМО 2022 (Санкт-Петербург, РФ, 2022); Пятьдесят первая (LI) научная и учебно-методическая конференция Университета ИТМО (Санкт-Петербург, РФ, 2022); Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева (Рязань, РФ, 2022); X

Конгресс молодых ученых (КМУ) ИТМО 2021 (Санкт-Петербург, РФ, 2021); VIII Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков “OpenBio 2021” (Кольцово, РФ, 2021); VII Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков “OpenBio 2020” (Кольцово, РФ, 2021); Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, РФ, 2019)

На основании данных, полученных в работе, было сделано 17 публикаций, 6 из которых являются статьями в журналах Nucleic Acid Research, ChemBioChem, Chemistry the European journal, Russian Journal of Bioorganic Chemistry и Theranostics, индексируемые в МБЦ Scopus и Web of Science.

**Достоверность научных достижений.** Эксперименты выполнялись как минимум в трехкратном воспроизведении с использованием современного оборудования для исследовательских работ с нуклеиновыми кислотами. Используемые методы исследования и расчетов - статистически верные.

**Личный вклад автора.** Глава с результатами исследований включает три подраздела: мультивалентные ДНКзимы, бивалентные АСО и аллостерические ДНК-конструкции. В этих трех частях, на всех этапах исследований, планирование и выполнение экспериментальных работ, обработка результатов и их визуализация с помощью диаграмм и графиков проводились непосредственно автором. Написание текста диссертации и создание рисунков, демонстрирующих полученные результаты, автор выполнял лично.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа выполнена на 125 страницах, содержит 7 таблиц и 48 рисунков. Структура работы включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение, выводы, список сокращений и терминов, список литературы. Список литературы содержит 163 источника. Диссертация оформлена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утвержденными в ГОСТ Р 7.0.11-2011.

#### **Материалы и методы исследования**

**Исследуемые олигонуклеотиды.** В работе использовались синтетические рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды (“ДНК-Синтез”, “Евроген” (Москва, Российская Федерация) и “Integrated DNA Technologies” (IDT, Коралвилль, Айова, США).

**В работе использовались следующие методики.**

*Дизайн олигонуклеотидов* проводился с использованием приложения MFold, в котором предсказывались вторичные структуры фрагментов РНК и их параметры свободной энергии ( $\Delta G$ ), а также рассчитывались значения температур плавления ( $T_m$ ) гибридов ДНК-доменов и участков целевых фрагментов РНК.

*Реакция расщепления РНК.* С расщепляющими агентами (РА) и РНК проводили инкубацию *in vitro* в физиологическом буфере (15 мМ NaCl, 150 мМ KCl, 50 мМ HEPES (pH 7,4), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>). Если в качестве РА использовался Дз-агент низкой концентрации (реакция проходит в условиях многократных оборотов), то реакцию расщепления останавливали добавлением буфера, содержащего мочевины (8 М мочевины, 15% 2×TBE). Если в качестве РА использовался АСО с добавлением РНКазы Н или Дз-агент высокой концентрации (реакция проходит в условиях однократного оборота), то для остановки реакции использовали буфер, содержащий формамид (85% деионизированный формамид, 15% 2×TBE).

*Визуализация расщепленной РНК* проводилась с помощью денатурирующего полиакриламидного геля (ПААГ). Пробы, содержащие РА и РНК, разделялись на фракции, где отображалась целая РНК и продукты расщепления. Вертикальный ПААГ электрофорез выполнялся с использованием набора Mini-PROTEAN Tetra (BioRad, США). Визуализация полученного геля проходила с использованием устройства гель-документирования ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, США).

*Расчет процента расщепления РНК* проводился с использованием программы Image Lab версии 6.1, где по яркости изображения полученного ПААГ из каждой дорожки рассчитывался процент продукта расщепления.

*Оценка активности РА* проводилась с расчетами процента расщепленной РНК, числа количества каталитических оборотов (TON) и обозреваемой константы псевдо-первого порядка ( $k_{obs}$ ). TON находился по формуле  $TON = [P]/[PA] * t$ , где [РА] – концентрация РНК-расщепляющих агентов, [P] – концентрация расщепленной РНК, t – время реакции. Для получения TON реакции расщепления РНК проводились в условиях множественных оборотов. Значение  $k_{obs}$  рассчитывалось по формуле  $k_{obs} = 1/t * \ln (PHK_o / PHK_o - [P])$ , где [PHK<sub>o</sub>] – начальная концентрация РНК-субстрата, [P] – концентрация расщепленной РНК, t – время реакции. Значения  $k_{obs}$  устанавливались при проведении расщепления РНК в условиях однократных оборотов.

*Оценка селективности действия РА* проводилась с расчетом фактора селективности (F(s)), который находился по формуле  $F(s) = 1 - TON_{mm} / TON$ . В ней TON<sub>mm</sub> обозначает число оборотов, которую показал РА, содержащий однонуклеотидную замену, TON – число оборотов РА, не содержащего замены. F(s), стремящийся ближе к 1, отражает высокую специфичность, а F(s), стремящийся к 0, – низкую селективность или её отсутствие.

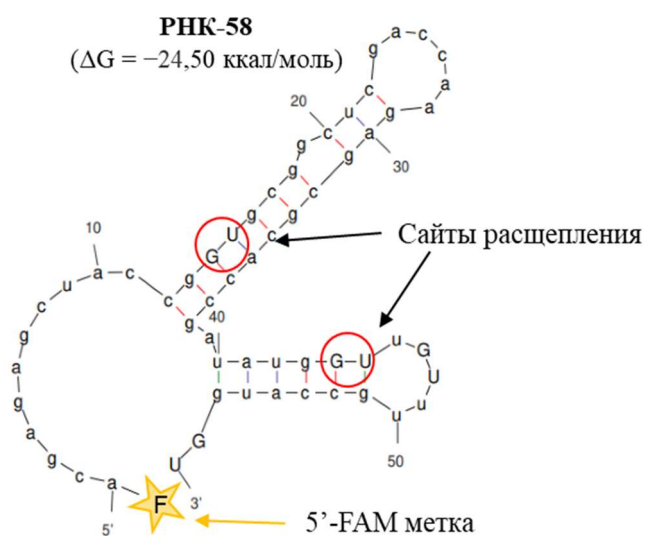


## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

### 1. Мультивалентные ДНКзимы

#### 1.1 Оценка вторичной структуры РНК-мишеней

В качестве РНК-мишеней были использованы три синтетических фрагмента РНК с различной стабильностью их вторичной структуры: РНК-58, РНК-104 и РНК-60. РНК-58 и РНК-104 являются фрагментами мРНК кассеты устойчивости к стрептомицину *strA* [Sundin G.W., et al. 1996]. Длина каждого фрагмента составляла 58 и 104 нуклеотидов (далее, нт), соответственно, а их вторичные структуры обладали высокой стабильностью ( $\Delta G = -24,5$  ккал/моль и  $-48,24$  ккал/моль). Фрагмент РНК-60, заимствованный из гена эукариотического фактора инициации трансляции 3 субъединицы С (EIF3С), имел длину 60 нуклеотидов и обладал менее стабильной вторичной структурой ( $\Delta G = -6,5$  ккал/моль) [Hershey J.W.B., et al. 2015]. Основная работа данной части была выполнена с фрагментом РНК-58 (рис. 1). Изображения и результаты работ с фрагментами РНК-104 и РНК-60 отображены в основном тексте диссертации. Расчеты вторичных структур РНК и их свободной энергии были выполнены в веб-сервисе RNA Folding Form Application из сервера UNAFold.

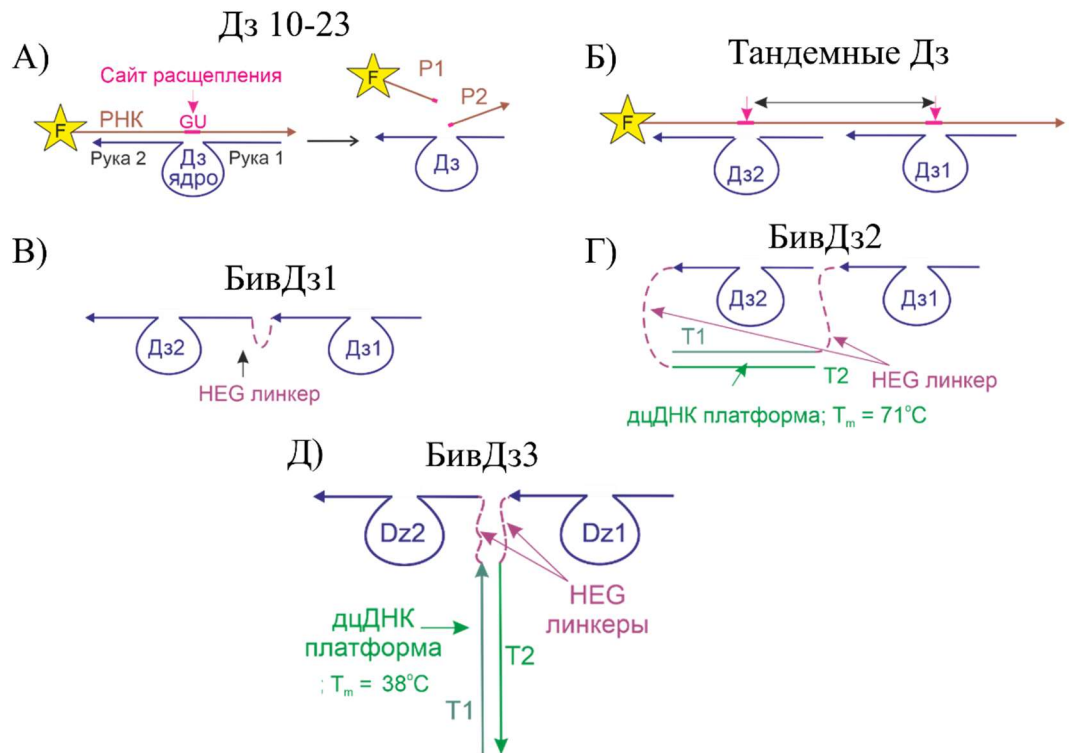


**Рис. 1.** Вторичная структура модельного синтетического РНК-фрагмента STR-58 длиной 58 нуклеотидов и  $\Delta G = -24,50$  ккал/моль. Красные кружки обозначают сайты расщепления Дз. Фрагмент РНК-58 помечен меткой флуоресцеина (FAM) на 5'-конце.

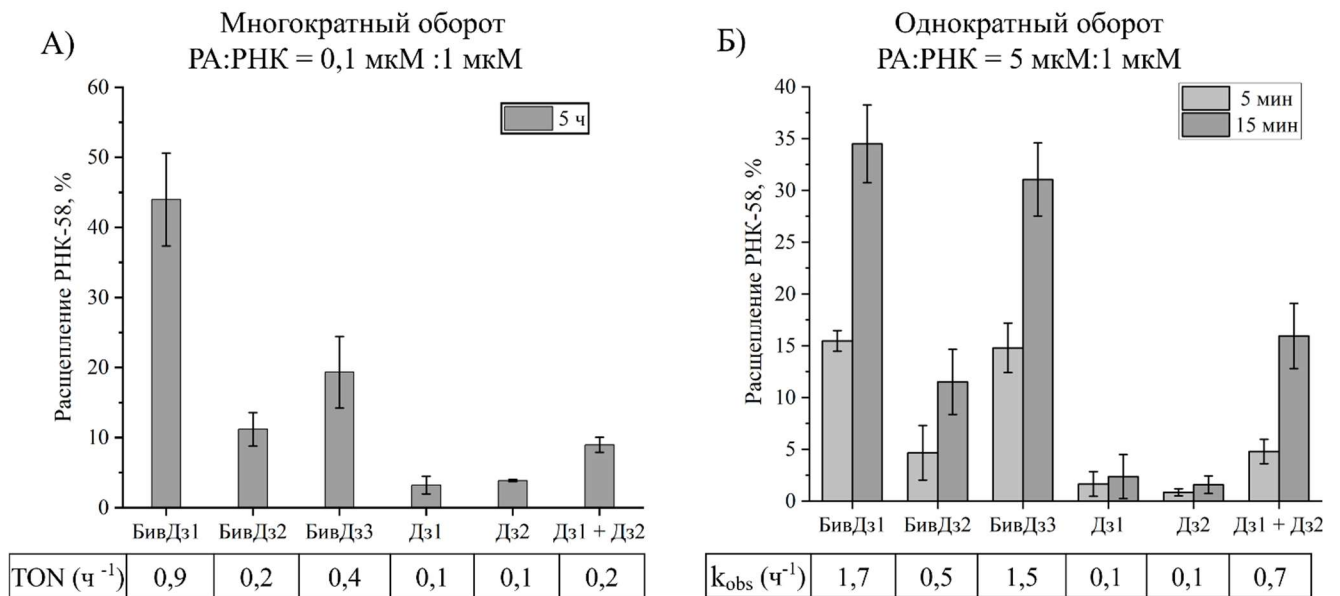
#### 1.2. Оценка эффективности мультивалентных конструкций с ДНКзимами традиционного дизайна на мишень РНК-58

Отдельные Дз1 и Дз2 (рис. 2А) продемонстрировали расщепление РНК-58 с  $k_{\text{obs}} \approx 0,1 \text{ ч}^{-1}$ , что ниже, чем при расщеплении линейных РНК-фрагментов ( $k_{\text{obs}} \approx 10 \text{ ч}^{-1}$ ) [Santoro S.W., et al. 1997; Nguyen K., et al. 2023]. Это коррелирует с предыдущими наблюдениями, что стабильные

структуры РНК замедляют реакцию расщепления [Nedorezova D.D., et al. 2024; Taylor A.I., et al. 2022], и показывает, что Дз-агенты традиционного дизайна неэффективны при расщеплении РНК со сложной вторичной структурой.



**Рис. 2.** Дизайны мультивалентных ДНКзимов. А) – Дз 10-23, Б) – Тандемные Дз Дз2 и Дз1, В) – Бивалентный Дз БивДз1, Г) – БивДз2, Д) – БивДз3, 4, 5, 6 с указанными  $T_m$  дцДНК-платформ. БивДз2-6 являются двухкомпонентными конструкциями ДНК, собирающимися через дцДНК-платформу.



**Рис. 3.** Расщепление РНК-58 с использованием агентов Дз и БивДз (РА). А) – Многократный оборот: РНК-58 (1 мкМ) инкубировали с каждым из агентов расщепления (0,1 мкМ) при 37 °С в течение 5 ч. Б) – Однократный оборот: РНК-58 (1 мкМ) инкубировали с каждым расщепляющим агентом (5 мкМ) при 37 °С в течение 5 или 15 мин.

В условиях многократного оборота тандем Дз1+Дз2 (рис. 2Б) продемонстрировал в 2 раза более эффективное расщепление, по сравнению с каждым отдельным Дз (рис. 3А). Это отражает незначительную кооперативность на этапе связывания РНК или ее отсутствие и может быть результатом независимого (некооперативного) расщепления РНК двумя агентами Дз. Это также указывает на то, что при низких концентрациях тандем Дз1+Дз2 неэффективен в связывании РНК. В условиях однократного оборота тандем Дз1 и Дз2 улучшал расщепление РНК в 7 раз по сравнению с каждым отдельным Дз (рис. 3Б, последняя группа столбиков). Таким образом, высокая концентрация Дз1 и Дз2 обеспечивает кооперативное связывание и разворачивание структуры РНК-58.

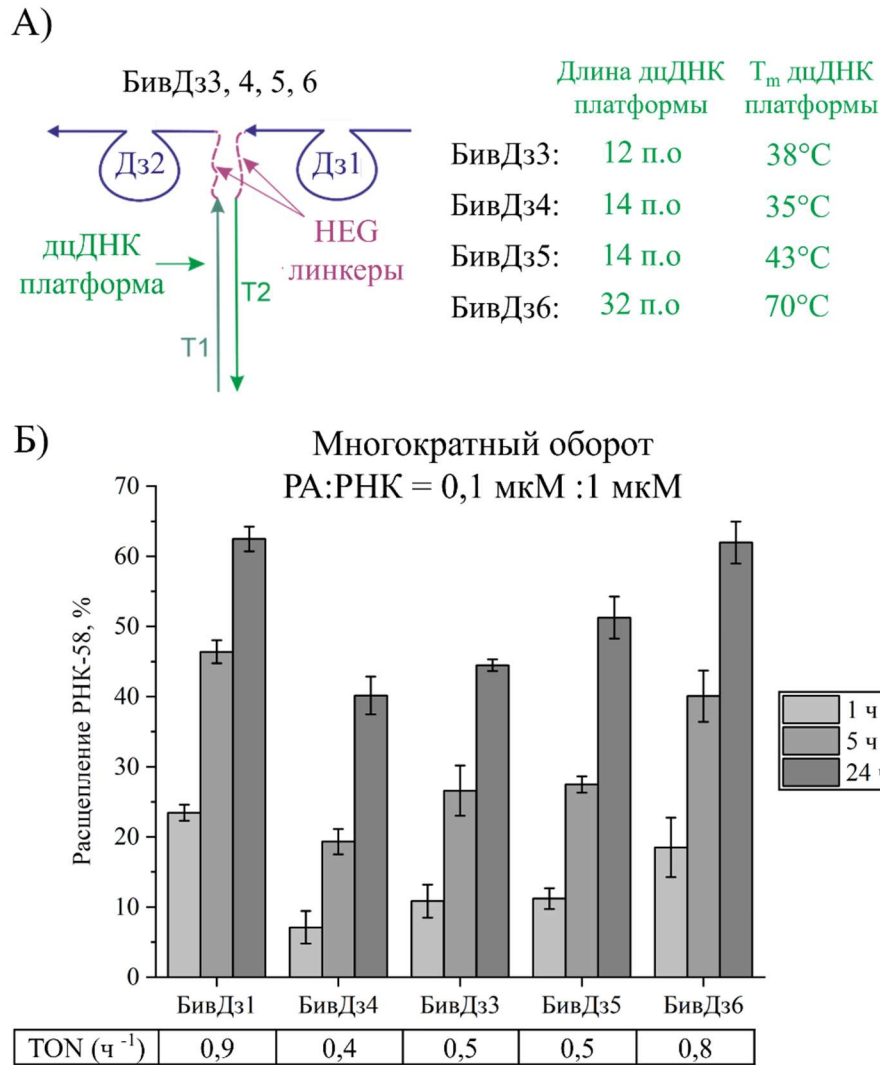
Далее, были изучены различные варианты расположения субъединиц Дз1 и Дз2 в бивалентной конструкции путем сравнения эффективности расщепления РНК с помощью БивДз1, 2 и 3 (рис. 2В–Д). В условиях многократного оборота все три БивДз улучшали ТОН по сравнению с Дз1 и Дз2, действующими по отдельности или вместе (рис. 3). БивДз1 продемонстрировал 9-и 4,5-кратное увеличение ТОН ( $0,9 \text{ ч}^{-1}$ ) по сравнению с Дз1 или Дз2 ( $0,1 \text{ ч}^{-1}$ ) и тандемом Дз1+Дз2 ( $0,2 \text{ ч}^{-1}$ ), соответственно. Такой высокий оборот расщепления субстрата позволяет предположить, что БивДз1 не ингибируется продуктами расщепления РНК из-за относительно коротких субстрат-связывающих доменов у каждого из Дз1 и Дз2.

В условиях однократного оборота наибольшая скорость расщепления была достигнута у БивДз1 и БивДз3 ( $k_{\text{obs}} \approx 1,7$  и  $1,5 \text{ ч}^{-1}$  соответственно), что в 17 и 15 раз превышало скорость расщепления у индивидуальных Дз1 и Дз2. Также наблюдалось 2-кратное улучшение по сравнению с тандемом Дз1+Дз2. Этот результат доказывает, что соединение двух единиц Дз в единую ДНК-конструкцию улучшает расщепление свернутого РНК-субстрата, вероятно, за счет улучшения стадии связывания.

Интересно, что активность БивДз2 была сопоставима или ниже, чем у тандема Дз1+Дз2. Предполагается, что низкий профиль расщепления БивДз2 связан с отсутствием эффективного взаимодействия между Дз1 и Дз2 из-за их значительного разделения в конструкции БивДз2 (рис. 3).

### 1.3 Оптимизация дцДНК-платформы

В условиях многократного оборота БивДз1 превосходит БивДз3 (рис. 4), что можно объяснить более низкой стабильностью платформы дцДНК в БивДз3. При  $T_m \sim 38^\circ\text{C}$  в условиях эксперимента ( $37^\circ\text{C}$ ) примерно половина Дз1 и Дз2 связаны друг с другом в дцДНК-платформе. Таким образом, повышение  $T_m$  в платформах дцДНК БивДз3 должно приблизить ее характеристики к показателям БивДз1. Для проверки этой гипотезы были сконструированы серии БивДз 4, 5 и 6, с различающейся структурой дцДНК-платформы (рис. 4А).



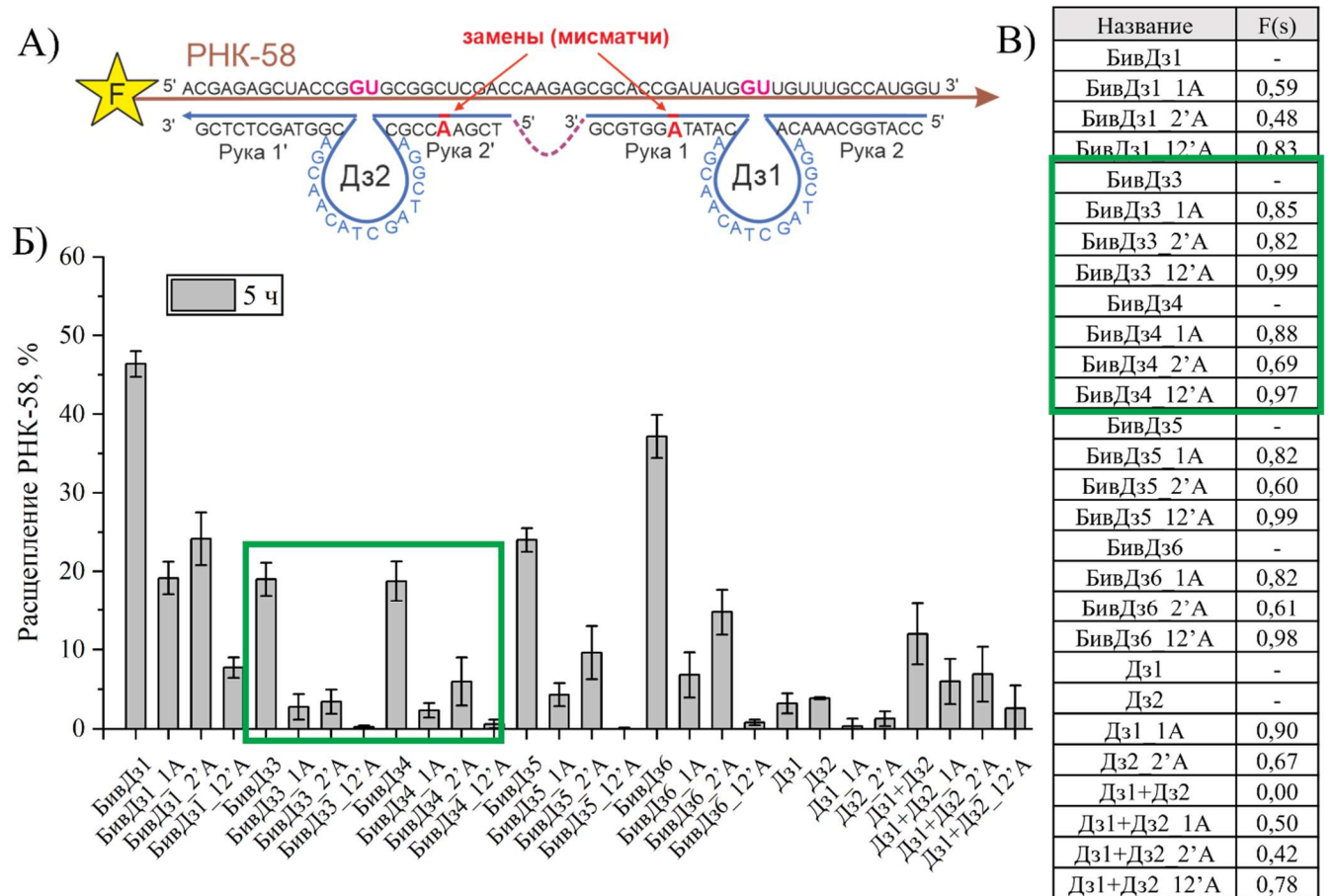
**Рис. 4.** Активность расщепления РНК зависит от стабильности платформы дцДНК в БивДз. А) – Дизайн БивДз-конструкций с различной длиной платформы дцДНК с указанием количества пар оснований (п.о.) и параметра  $T_m$ . Эти данные также указаны в таблице 2 в разделе 2.3. Б) – Расщепление РНК-58 с помощью БивДз1, 3-6 в условиях многократного оборота. Число оборотов (TON) рассчитывали после 5 ч инкубации.

Увеличение  $T_m$  платформы дцДНК продемонстрировало последовательное увеличение активности БивДз в условиях многократного оборота, при этом наиболее стабильная платформа дцДНК БивДз6 имела число оборотов, сравнимое с БивДз1 (рис. 4Б). Это подтверждает нашу гипотезу о том, что лимитирующим этапом в расщеплении свернутой РНК является связывание с ней, и эту проблему можно решить, усилив кооперативность связывания путем стабилизации платформы дцДНК через её удлинение. Из-за более высокого среднего числа оборотов TON в следующих исследованиях использовался в основном БивДз1 как оптимальный БивДз.

#### 1.4 Оценка селективности действия БивДз

Для проведения экспериментов с оценкой селективности конструкций БивДз были разработаны их вариации (а именно БивДз1, 3, 4) с включенными нуклеотидными заменами

(мисматчами) в их РНК-связывающие руки. Такая же модификация была проделана с Дз1 и Дз2 (рис. 5А). Далее, в условиях многократных оборотов был проведен сравнительный анализ РНК-расщепляющего действия модифицированных конструкций и исходных БивДз и Дз, не содержащих замен. Специфичность каждого агента Дз оценивали с помощью коэффициента селективности  $F(s)$ . БивДз1 продемонстрировал лишь умеренную специфичность, только наличие обеих мисматчей приводило к высокому значению  $F(s)$ , равному 0,83 (рис. 5В). Это коррелирует с дилеммой аффинности/специфичности: БивДз1 обладает высоким сродством с РНК-58, но обладает самой низкой селективностью [Nedorezova D.D., et al. 2022; Demidov V.V., et al. 2004].



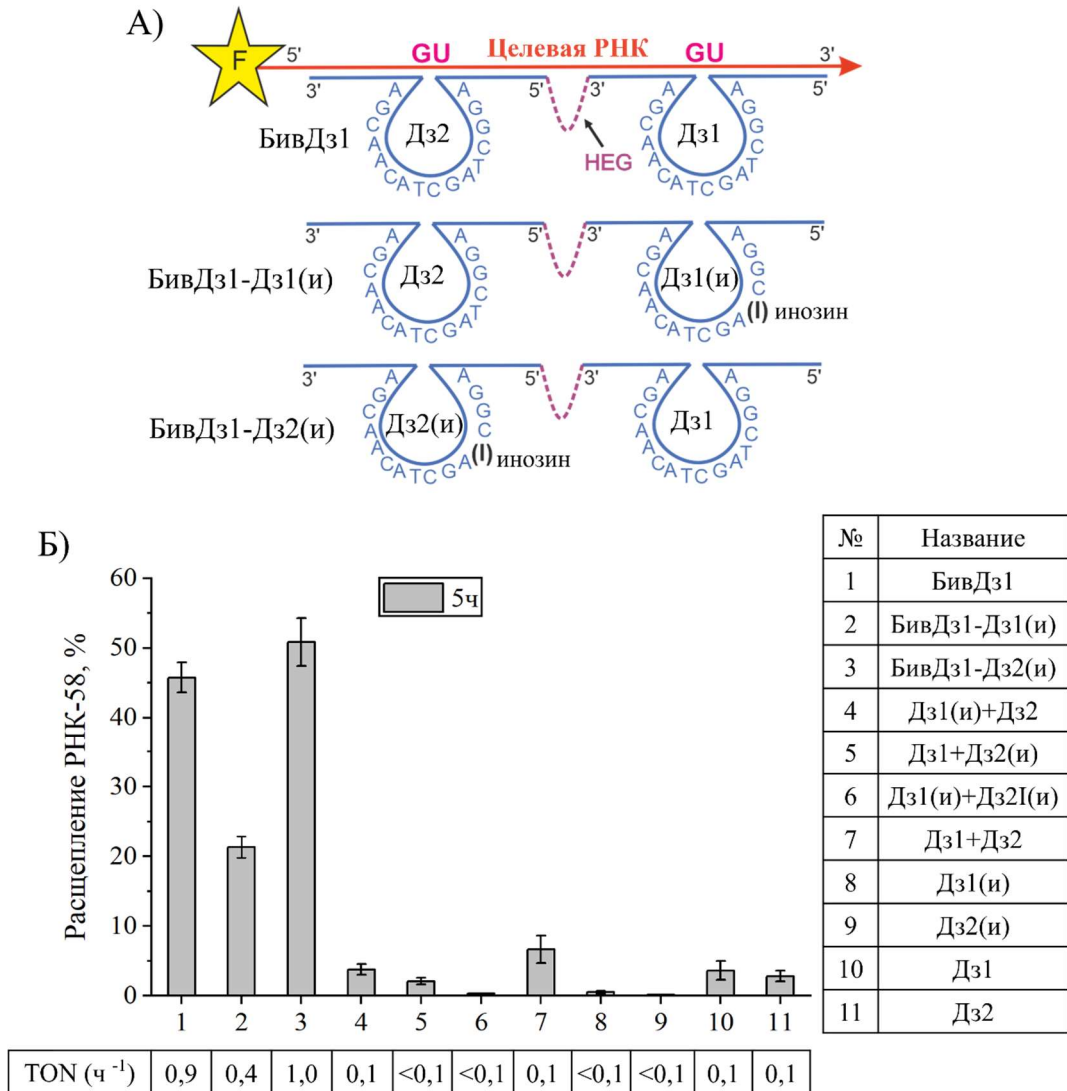
**Рис. 5.** Расщепление РНК-58 Дз и БивДз, имеющими одну нуклеотидную замену в одном (1А или 2'А) или двух (12'А) участках. А) – Схема расположения нуклеотидных замен в последовательностях Дз1 и Дз2. Б) – Относительная эффективность расщепления РНК-58 в условиях многократного оборота (5 ч, 1 мкМ РНК, 0,1 мкМ Дз-агентов). В) – Таблица с коэффициентами селективности  $F(s)$  для РНК-расщепляющих БивДз и Дз с заменами и без них. Прямоугольной рамкой на гистограмме и таблице отмечены результаты расщепления агентами БивДз3 и БивДз4, которые продемонстрировали наиболее высокий  $F(s)$  в присутствии хотя бы одной замены (столбики БивДз3\_1А, БивДз3\_2'А, БивДз4\_1А, и БивДз4\_2'А).

БивДз3 и БивДз4 продемонстрировали самые высокие  $F(s)$  среди всех БивДз, что коррелирует с самой низкой  $T_m$  их дцДНК-платформ (35°C и 37°C). БивДз3 и БивДз4 могут быть

использованы в качестве высокоселективной альтернативы БивДз1, если необходимо достичь специфичности нокдауна генов.

### 1.5 Оценка влияния количества каталитических ядер на общее число оборотов БивДз1

В этой части исследования оценивался относительный вклад связывания и числа каталитических ядер на активность расщепления БивДз1. Для этого были сконструированы Дз1(и), Дз2(и) и БивДз1(и) с каталитически неактивными Дз, у которых тимин (Т4) заменен на инозин в последовательности каталитического ядра (рис. 6А).



**Рис. 6.** Влияние мутации в каталитическом ядре Дз на эффективность расщепления РНК. А) – Локализация мутаций с заменой тимидина на инозин в конструкции БивДз1. Б) – Эффективность расщепления РНК-58 различными агентами Дз в различных условиях, и соответствующие числа оборотов (TON).

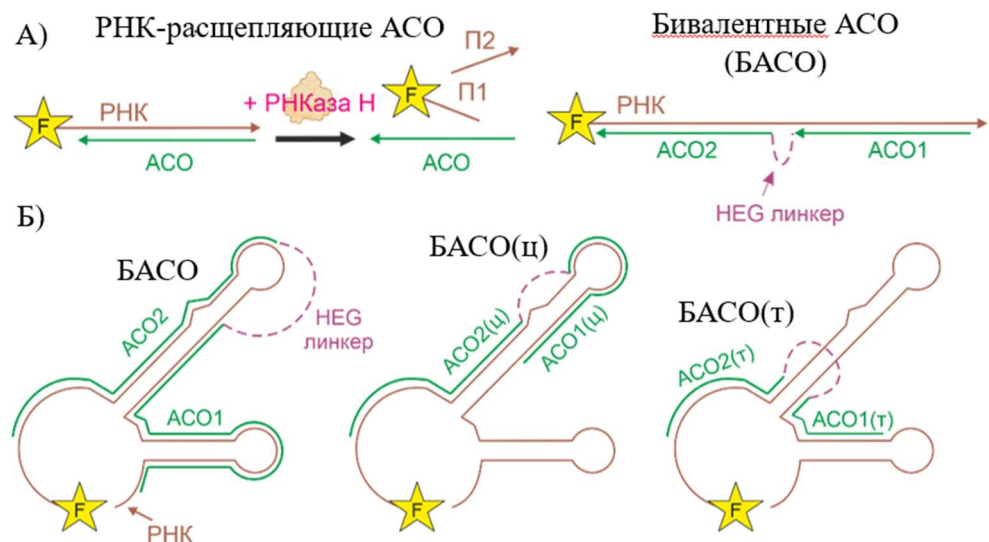
Дз1(и) и Дз2(и) были абсолютно неактивными в расщеплении РНК (рис. 6Б, столбики 8 и 9). Использование тандемов Дз1(и) и Дз2 (рис. 6Б, столбики 4 и 5) и Дз1 с Дз2(и) не привело к увеличению эффективности расщепления по сравнению с одиночными Дз (рис. 6Б, столбики 10

и 11). Напротив, БивДз1, содержащий один неактивный Дз (БивДз1-Дз1(и) или БивДз1-Дз2(и)), сохранял большую часть своей активности (рис. 6Б, столбики 2 и 3). Предполагается, что, несмотря на отсутствие каталитической активности, инактивированный Дз в БивДз1(и) проявляет кооперативное взаимодействие с активным Дз по поддержанию связывания с РНК. Каталитически активное ядро у Дз1 добавляет ~30% эффективности расщепления БивДз1 (столбики 1 и 2). При этом, активное ядро Дз2 и вовсе не вносит вклад в эффективность расщепления БивДз1. Из всего эксперимента можно сделать вывод, что эффективность БивДз1 повышается как за счет увеличения сродства к связыванию РНК, так и, частично, за счет увеличения вероятности расщепления РНК.

## 2. Бивалентные АСО

### 2.1 Оценка эффективности и селективности РНК-расщепляющего действия БивАСО

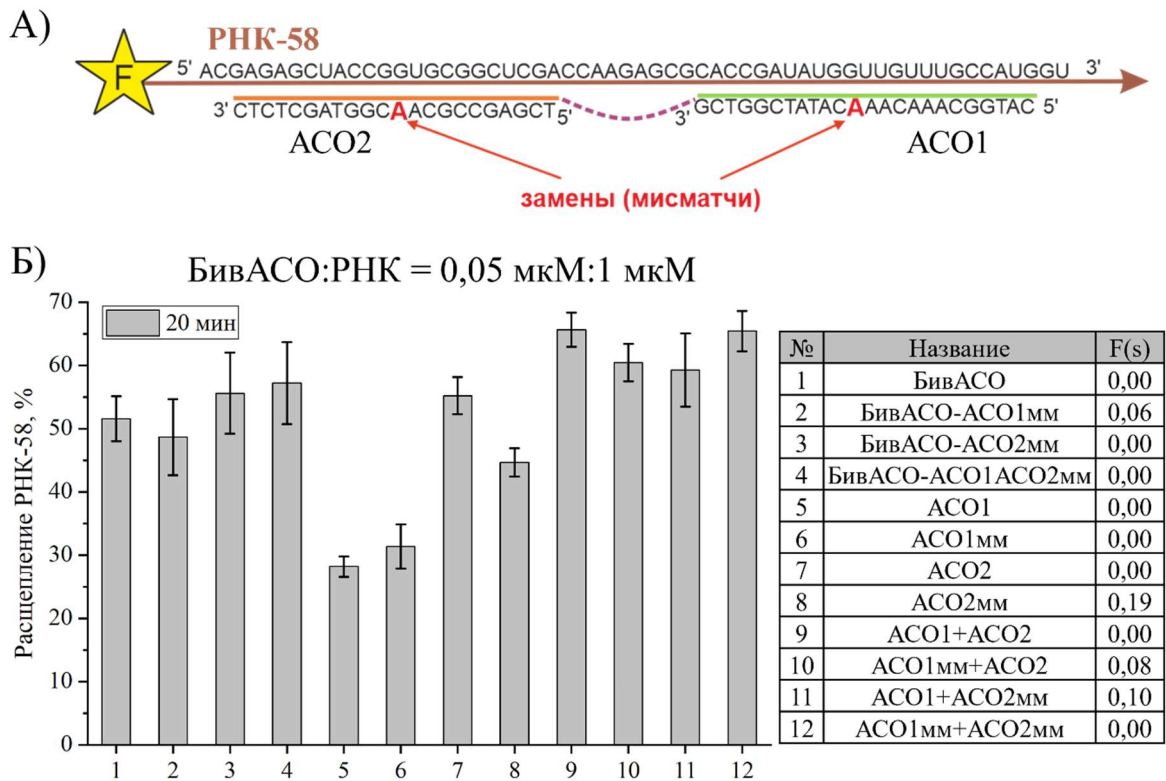
Дизайны тестируемых модификаций АСО (АСО и БивАСО) представлены на рис. 7.



**Рис. 7.** Бивалентные модификации АСО. А) – Общая схема АСО и его модификации БивАСО. Б) – Разработанные вариации БивАСО с тремя разными дизайнами, нацеленные на фрагмент РНК-58: оригинальный (БивАСО), цис-ориентированный (БивАСО(ц)) и транс-ориентированный (БивАСО(т)).

БивАСО демонстрирует 50% расщепления РНК, что, с одной стороны, в 2 раза больше, чем это показывает АСО1 (24%), но лишь немного превосходит АСО2 (45%) и показывает значительно меньшее расщепление, чем АСО1 и АСО2 в тандеме при расщеплении РНК (рис. 8Б, столбики 1, 5, 7, 9). Цис-ориентированный БивАСО(ц) вовсе показывает обратный эффект. БивАСО(ц) и составляющий его АСО1(ц) продемонстрировали расщепление лишь ~10% РНК, в то время, как АСО2(ц), также включенный в структуру БивАСО(ц), продемонстрировал в 5 раз больше расщепление (52%), что также выше, чем тандем АСО1(ц) и АСО2(ц) (48%) (рис. 36Б в основном тексте диссертации). Ингибирование РНК-расщепляющего действия при

использовании БивАСО(ц) или тандема АСО(ц) объясняется тем, что у БивАСО(ц) присутствуют участки, где оба АСО комплементарно связываются между собой, и при комплементарном связывании с АСО1(ц), у АСО2(ц) на 5'-конце отсутствует свободная цепь для связи с РНК.



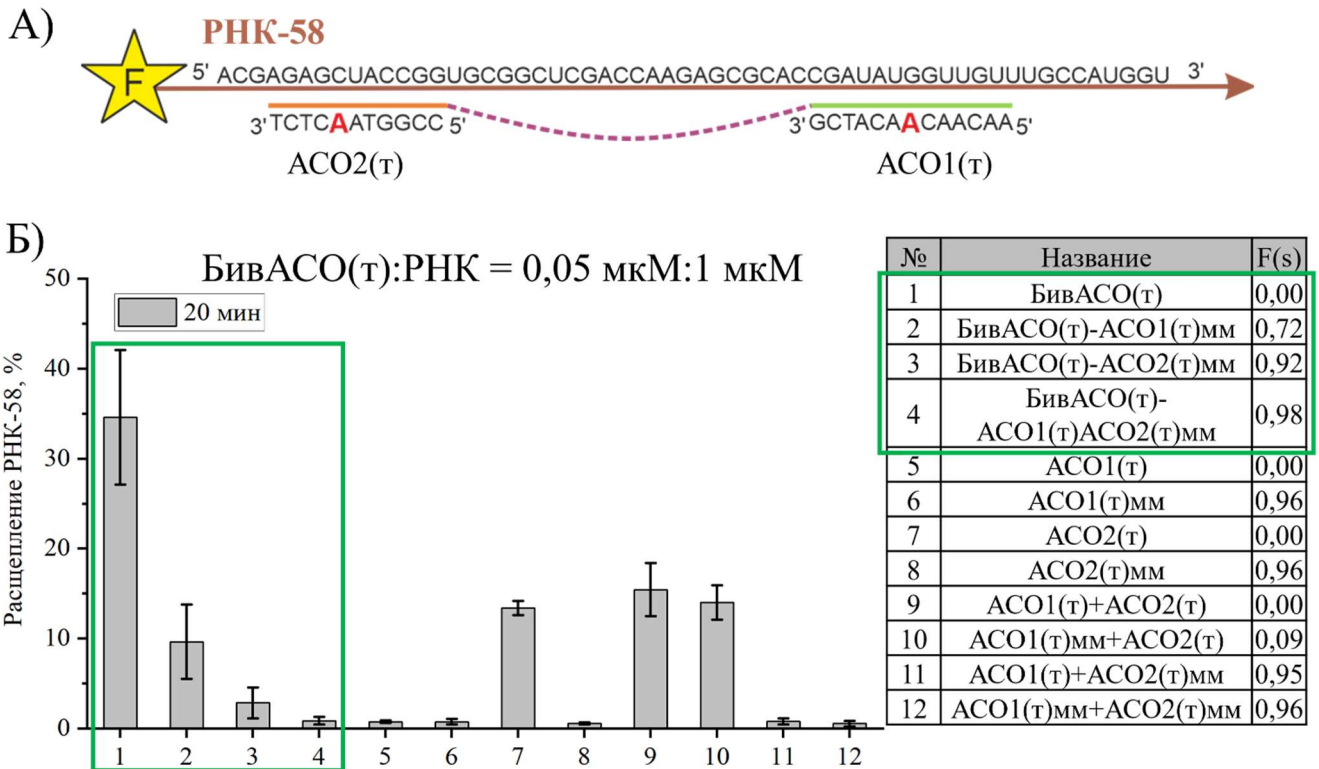
**Рис. 8.** Расщепление РНК-58 с использованием БивАСО с мисматчами и без мисматчей. А) – графическая схема БивАСО с указанным положением мисматчей. Б) – Профиль расщепления БивАСО в виде гистограммы и таблица с расшифровкой образцов и указанными для каждого образца значениями F(s). Образцы с мисматчами имеют подпись «мм».

Для оценки специфичности действий БивАСО были разработаны их модификации, где в каждом составляющем соответствующую бивалентную конструкцию АСО были внедрены одиночные мисматчи (рис. 8А, 9А). Далее проводилось сравнение РНК-расщепляющей активности модифицированных АСО-агентов с АСО-агентами без мисматчей, полученные результаты использовали для расчета коэффициентов селективности F(s) для каждого РА.

БивАСО, как и тандем АСО1 и АСО2, не показали какой-либо специфичности действия, (F(s) = 0) (рис. 8Б, столбики 2-4). Отсутствие селективности было ожидаемым из-за высокой аффинности и, соответственно, высокой толерантности к нуклеотидным заменам у длинных отдельных АСО, находящихся в составе бивалента БивАСО.

БивАСО(ц) и БивАСО(т) были разработаны, как вариации БивАСО с более короткими АСО, обладающие повышенной чувствительностью к мисматчам в РНК цепях. БивАСО(ц) продемонстрировал специфичность при наличии одного мисматча в АСО2(ц) (F(s) = 0,68) и двух мисматчей в обоих АСО(ц) (F(s) = 0,72) (рис. 37Б в основном тексте диссертации).





**Рис. 9.** Расщепление РНК-58 с использованием БивАСО(Т) с мисматчами и без мисматчей. А) – Изображения БивАСО с указанным положением мисматчей (большая буква А в сиквенсах АСО), Б) – Профиль расщепления БивАСО(Т) в виде гистограммы и таблицы с расшифровкой образцов и указанными к ним значениями F(s). Прямоугольником в гистограмме и таблице обозначены результаты, где БивАСО(Т) демонстрирует наибольшие значения F(s).

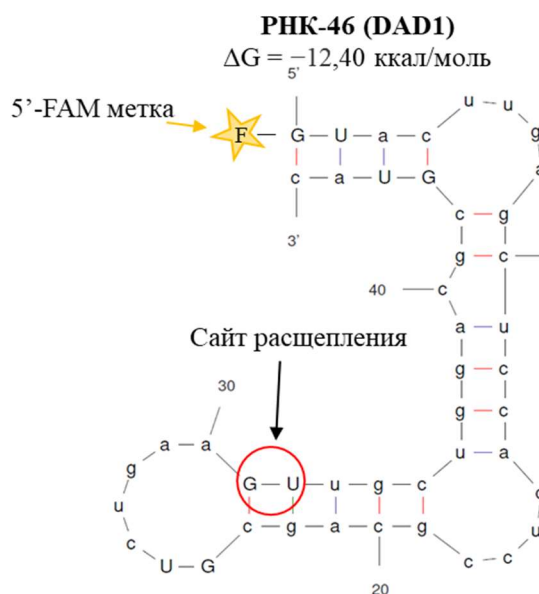
Однако, из-за того, что активность БивАСО(ц) изначально низкая (менее 5%), селективность действия этой модификации не является значимой. Модификация БивАСО(Т) показала наиболее высокую специфичность как при замене только в АСО1 (F(s) = 0,72) и при замене в АСО2 (F(s) = 0,92), сохранив при этом заметную эффективность при полном комплементарном связывании (рис. 9Б, столбики 2-4). Также представляет интерес, что в тандеме АСО1(Т)+АСО2(Т) отсутствует специфика при замене в последнем АСО. Таким образом, БивАСО(Т) с короткими доменами, нацеленными на участки РНК и расположенными так, что почти полностью не влияют на её вторичную структуру, могут быть использованы в качестве эффективной и селективной альтернативы длинным АСО агентам.

### 3. Аллостерические ДНКзимы (БинДз) и ДНК-конструкции (БинДМ) на их основе

#### 3.1. Подбор РНК-мишеней для БинДз и БинДМ

В данной части работы в качестве РНК-мишеней использовались три синтетических фрагмента РНК разной длины, имеющие разную стабильность их вторичной структуры: РНК-46, РНК-47 и РНК-65. РНК-46 – фрагмент длиной 46 нт, последовательность которого была заимствована из мРНК гена DAD1 (Defender Against Cell Death), который является одним из генов

«домашнего хозяйства», ингибирование которого приводит к запуску апоптоза [Brewster J.L., et al. 2000]. Свободная энергия её вторичной структуры  $\Delta G = -12,40$  ккал/моль (рис. 10).



**Рис. 10.** Вторичная структура фрагмента РНК-46, предсказанная и визуализированная с помощью веб-сервиса RNA Folding Form Application сервера UNAFold. На 5'-конце расположен флуоресцеин (FAM). Сайт расщепления, где действуют Дз-агенты, обозначен красным кругом и стрелкой. Свободная энергия  $\Delta G$  у вторичной структуры фрагмента =  $-12,40$  ккал/моль.

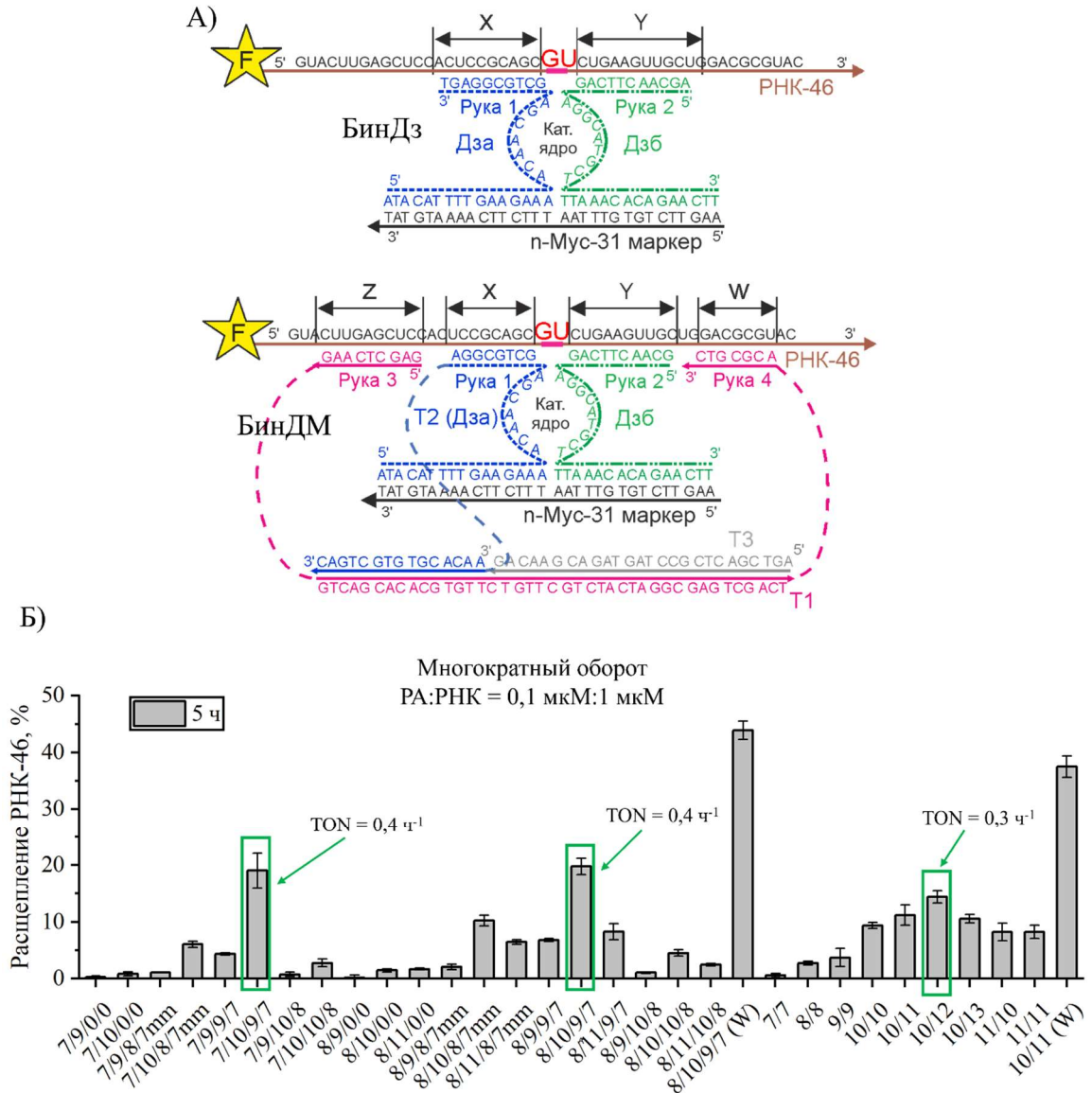
Можно предположить, что использование БинДз и БинДМ в присутствии определенных генетических маркеров конкретных клеточных линий (например, раковых) будет ингибировать ген DAD1, селективно вызывая апоптоз. РНК-47 – фрагмент мРНК гена *strA*, длиной 47 нт, являющийся вариацией фрагмента РНК-58, описанного ранее в подразделе, посвященном конструкциям БивДз. Вторичная структура РНК-47 обладает низкой свободной энергией ( $\Delta G = -15,50$  ккал/моль). РНК-65 представляет собой фрагмент длиной 65 нт, заимствованный из мРНК гена *infB*, который кодирует белок IF-2, являющийся инициатором трансляции у штаммов бактерий *E.coli* [Gertsen A.V., et al. 2020]. Несмотря на большую длину, вторичная структура фрагмента РНК-65 является наименее стабильной из представленных фрагментов РНК ( $\Delta G = -7,50$  ккал/моль). Основные результаты были получены при исследовании фрагмента РНК-46, поэтому, подробное описание будет посвящено только РНК-46. Изображения фрагментов РНК-47 и РНК-65, а также результаты их исследования, представлены в основном тексте диссертации.

### 3.2 Оптимизация бинарных Дз-конструкций БинДз и БинДМ

В этом разделе проводилась оптимизация РНК-связывающих рук, где были проверены 143 варианта БинДз и БинДМ на трех РНК-мишенях. Этап оптимизации проводился с инкубацией в условиях многократного оборота (РА:РНК = 0,1:1 мкМ). Время инкубации составляло 5 часов,

поскольку в этот временной промежуток катализ РА находился в фазе реакции далекой от достижения плато в условиях эксперимента.

Профили расщепления РНК-46 показали, что БинДз 7/10/9/7 и 8/10/9/7 демонстрировали TON 0,4 ч<sup>-1</sup>, что было больше, чем у лучшего БинДз 10/12 (0,3 и 0,4 ч<sup>-1</sup>, рис. 11В).

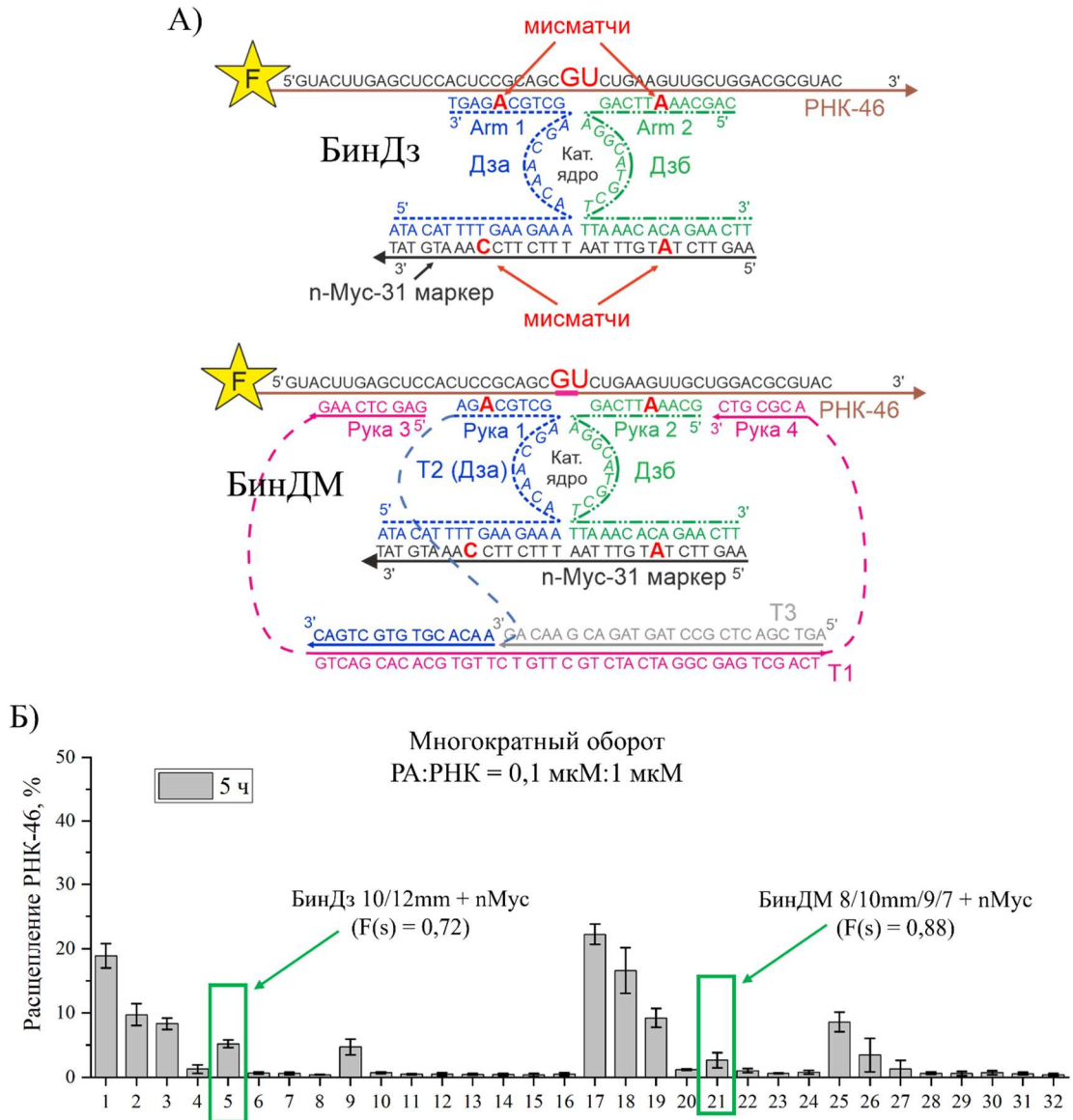


**Рис. 11.** А) Дизайн конструкций БинДз и БинДМ с варьирующимися длинами РНК-гибридирующих рук: X/Y и X/Y/Z/W, соответственно. Б) Гистограмма расщепления РНК-46 с БинДз и БинДМ, различающихся длинами рук. TON обозначены для образцов, продемонстрировавших наибольший процент расщепления РНК. Образцы с обозначением (W) – РА с цельным ядром, выступающие в качестве положительного контроля

Как и ожидалось, БинДз без рук 3 и 4, и РА с более короткими руками не показали значительного расщепления РНК из-за низкого сродства к свернутой РНК-46 (рис. 11В). Этот результат демонстрирует, что дополнительные руки 3 и 4 улучшают каталитическое расщепление сложных РНК-мишеней БинДз.

### 3.3 Селективность действия БинДз и БинДМ

Чтобы проверить селективность оптимизированных БинДМ и БинДз, были разработаны их модификации с включенными мисматчами в их РНК-связывающих руках. В условиях многократных оборотов было проведено сравнение РНК-расщепляющей активности модифицированных РА и РА, не содержащих мисматчи (рис. 12А). Селективность РА оценивали по коэффициенту селективности  $F(s)$ .



**Рис. 12.** Специфичность расщепления РНК-46 с использованием БинДз и БинДМ. А) – Изображения мисматчей, локализованных в БинДз и БинДМ в одной или двух руках, а также в одном или двух сайтах маркера. Наличие мисматча в определенной руке обозначается у образца припиской «mm» к числу нуклеотидов соответствующей руки БинДз или БинДМ. Б) – Расщепление РНК-46 в условиях многократного оборота (5 ч, 1 мкМ РНК, 0,1 мкМ РА). В столбиках 5 и 21 прямоугольниками обозначены БинДз и БинДм, демонстрирующие наименьшее расщепление РНК при наличии мисматча только в одной руке (рука 2).  $F(s)$  образцов указан вместе с названием. Описание результатов расщепления РНК у БинДз и БинДМ с мисматчами в маркере n-Myc описаны в основном тексте диссертации.

Наличие замены одного основания в руке 2 снижало расщепление РНК-46 как у оптимизированного БинДз, так и БинДМ, в результате чего  $F(s)$  составляла 0,72 и 0,88, соответственно (рис. 12Б, образцы № 5 и 21). Заметное улучшение селективности БинДМ можно объяснить более короткой рукой 2 в БинДМ 8/10/9/7, чем в БинДз 10/12. Более короткая рука длиной 10 нт, комплементарная целевой РНК, дестабилизирует образование комплекса Дз:РНК в присутствии мисматча в большей степени, чем более длинная рука (12 нт), с тем же самым мисматчем. Это наблюдение иллюстрирует потенциал дизайна БинДМ для решения дилеммы аффинности/специфичности.

## ВЫВОДЫ

1. Бивалентные конструкции БивДз каталитически расщепляют специфическую РНК со стабильной структурой с эффективностью до 17 раз большей по сравнению с Дз традиционного дизайна, демонстрируя многократно большую скорость расщепления и число каталитических оборотов как из-за более высокой аффинности, обеспечиваемой четырьмя РНК-связывающими доменами, так и из-за наличия большего числа каталитических ядер.
2. У конструкций БивДз, с высокой РНК-расщепляющей активностью, можно существенно повысить специфичность распознавания однонуклеотидных замен ( $F(s) > 0.80$ ) путем уменьшения стабильности связывания двух Дз доменов друг с другом в составе бивалентной конструкции.
3. Конструкции БивАСО могут эффективно и селективно стимулировать РНКазы-Н-опосредованное расщепление целевой РНК (~35% за 20 мин,  $F(s) > 0.70$ ), если оба домена АСО короткие, и они одновременно связываются с участками РНК, фланкирующими вторичную структуру.
4. Аллостерические конструкции БинДз демонстрируют расщепление РНК лишь в присутствии специфической последовательности – активатора (генетического маркера), а добавление двух дополнительных РНК-связывающих рук (БинДМ) может давать прирост расщепления РНК со стабильной вторичной структурой.
5. РНК-расщепляющая активность конструкций БинДМ может обладать большей специфичностью по сравнению с конструкциями БинДз, если нуклеотидные замены распознаются доменом, не входящим в состав собранной ДНК-конструкции.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

## Публикации в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science

1. **Dubovichenko M.V.** Multivalent DNAzyme agents for cleaving folded RNA / Batsa M, Bobkov G.A, Vlasov G.S, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2024. – Vol. 52(10). – P. 5866–5879. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae295>
2. **Dubovichenko M.V.** Comparison of antisense oligonucleotides, DNAzymes and their bivalent forms in RNase H dependent cleavage of folded RNA / Nnanyereugo V.O, Bobkov G.A, ElDeeb A.A, et al. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2024. – Vol. 30. – P. 2558–2566. <https://doi.org/10.1134/S1068162024060219>
3. **Dubovichenko M.V.** Marker-Dependent Cleavage of RNA by Binary (split) DNAzyme (BiDz) and Binary DNA Machines (BiDM) / Nedorezova D.D., Patra C., Drozd V.S., et al. // *ChemBioChem.* – 2024. – Vol. 25(24). – Article ID e202400665. <https://doi.org/10.1002/cbic.202400665>
4. Nedorezova D.D. Cleaving Folded RNA by Multifunctional DNAzyme Nanomachines / **Dubovichenko M.V**, Eldeeb A. A, Nour M. A. Y, et al. // *Chem. Eur. J.* – 2024. – Vol. 30. – Article ID e202401580. <https://doi.org/10.1002/chem.202401580>
5. Nedorezova D.D. Cleaving Folded RNA with DNAzyme Agents / **Dubovichenko M.V**, Kalnin A.J, Nour M.A.Y, et al. // *Chembiochem.* – 2024 – Vol. 25(1). – Article ID e202300637. <https://doi.org/10.1002/cbic.202300637>
6. Nedorezova D.D. Specificity of oligonucleotide gene therapy (OGT) agents / **Dubovichenko M.V**, Belyaeva E.P, Grigorieva E.D, et al. // *Theranostics.* – 2022 – Vol. 12(16). – P. 7132–7157. <https://doi.org/10.7150/thno.77830>

## Публикации в других изданиях

7. **Дубовиченко М.В.** Мультивалентные ДНКзимы для эффективного расщепления РНК / Батса М., Бобков Г.А., Власов Г.С., ЭльДиб А.А., Колпашиков Д.М. // *Материалы междунар. науч. конф. молодых ученых.* – Алматы: ИМББ. – 2023. – с. 24.
8. **Дубовиченко М.В.** Мультивалентные ДНКзимы, как эффективные агенты для расщепления РНК / Колпашиков Д.М. // *Труды 65-й Всероссийской научной конференции МФТИ в честь 115-летия Л.Д.Ландау, 3–8 апреля 2023 г. Биологическая и медицинская физика.* — М: Физматкнига, – 2023. – с. 186.
9. Batsa M. Bivalent System of Deoxyribozymes for Efficient RNA Cleavage / **Dubovichenko M.V**, and Kolpashchikov D.M. // *Biol. Life Sci. Forum.* – 2022. – Vol. 20(1). – P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/IECBM2022-13510>

10. **Дубовиченко М.В.** Мультивалентные терапевтические нуклеиновые кислоты для нокдауна генов. / Батса М., Бобков Г.А., Колпашиков Д.М. // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. — Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ. — 2022. — с. 517.
11. **Дубовиченко М.В.** Мультивалентные днкзимы для расщепления целевой РНК / Батса М., Колпашиков Д.М. // Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание. — СПб: Университет ИТМО. — 2022. — с. 1–2.
12. **Дубовиченко М.В.** Мультивалентные ДНК-устройства для целевого разрезания РНК. / Колпашиков Д.М. // Пятьдесят первая (LI) научная и учебно-методическая конференция Университета ИТМО. 2-5 февраля 2022 г. — СПб: Университет ИТМО. — 2022. — с. 30.
13. **Дубовиченко М.В.** Бивалентные ДНКзимы для эффективного расщепления целевых РНК / Колпашиков Д.М. // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (26-27 января 2022 г.). — Рязань: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. — 2022. — с. 20–22.
14. **Дубовиченко М.В.** Бивалентные ДНК-устройства для ингибирования РНК / Колпашиков Д.М. // Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание. — СПб: Университет ИТМО. — 2021. — с. 1–2.
15. **Dubovichenko M.V.** RNA-cleaving bivalent DNA-devices for inhibition of gene expression / Batsa M, Bobkov G.A., Kolpashchikov D.M. // VIII Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. — Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ. — 2021. — с. 279–280.
16. **Dubovichenko M.V.** Bivalent DNA-devices for RNA-specific inhibition for cancer therapy / Kolpashchikov D.M. // VII Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. — Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ. — 2020. — с. 433–435.
17. **Дубовиченко М.В.** Оптимизация дезоксирибозимов для расщепления гена домашнего хозяйства DAD1 / Недорезова Д.Д., Колпашиков Д.М. // Сборник тезисов Международного Конгресса «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (18-22 июня 2019 г.). — Санкт-Петербург: Издательство ВВМ. — 2019. — с. 978.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная РНК

ТНК – терапевтические нуклеиновые кислоты

АСО – антисмысловые олигонуклеотиды

Дз – (от англ. Dz) ДНКзим

МДз – мультивалентный ДНКзим

БивДз – бивалентный ДНКзим

нт – число нуклеотидов

TON – (англ. turnover number) число каталитических оборотов

T<sub>m</sub> – (англ. melting temperature) температура плавления

дцДНК – двуцепочечная ДНК

Дз(и) – инактивированный ДНКзим

БивАСО – бивалентный АСО

БинДз – бинарный ДНКзим

БинДМ – бинарная ДНК-машина

n-Мус – маркер нейробластомы



**Дубовиченко Михаил Вадимович (Российская Федерация)**

**Многофункциональные терапевтические олигонуклеотиды для улучшения  
эффективности и селективности расщепления РНК**

Настоящая диссертация посвящена разработке и исследованию мультивалентных и аллостерических (маркер-зависимых или маркер-активируемых) конструкций на основе терапевтических олигонуклеотидов (ДНКзимов и антисмысловых олигонуклеотидов), решающих дилемму аффинности и специфичности расщепления целевых РНК в их сложных участках. Была проделана оптимизация дизайнов ДНК-конструкций, установлены факторы, влияющие на их РНК-расщепляющую активность. Для оптимальных конструкций была охарактеризована специфичность связывания с целевыми РНК. Бивалентная конструкция БивДз1 расщепила свернутую РНК в 17 раз эффективнее ( $k_{obs} \approx 1,7 \text{ ч}^{-1}$ ), чем ДНКзимы исходного дизайна. Вариант БивДз3 в свою очередь продемонстрировал наибольшую специфичность ( $F(s) > 0.80$ ), сохранив при этом высокую эффективность ( $k_{obs} \approx 1,5 \text{ ч}^{-1}$ ). На основе БивДз была разработана конструкция из антисмысловых олигонуклеотидов БивАСО(т), расщепившая ~35% РНК за 20 мин с высокой специфичностью ( $F(s) > 0.70$ ). Аллостерические конструкции БинДз продемонстрировали расщепление сложной РНК только в присутствии генетического маркера ( $TON = 0,3 \text{ ч}^{-1}$ ,  $F(s) = 0,72$ ), а наличие дополнительных РНК-связующих доменов у конструкции БинДМ способствовало увеличению эффективности расщепления РНК и специфичности связывания с ней ( $TON = 0,4 \text{ ч}^{-1}$ ,  $F(s) = 0,88$ ).

**Mikhail Vadimovich Dubovichenko (Russian Federation)**

**Multifunctional therapeutic oligonucleotides for improving efficiency and selectivity of  
RNA cleavage**

This thesis is devoted to the design and study of multivalent and allosteric (marker-dependent or marker-activated) constructs based on therapeutic oligonucleotides (DNAzymes and antisense oligonucleotides) that solve the dilemma of affinity and specificity of target RNA cleavage in their complex regions. Optimization of DNA construct designs was performed, and factors affecting their RNA cleavage activity were established. The specificity of binding to target RNAs was characterized for the optimal constructs. The bivalent construct BivDz1 cleaved folded RNA 17-fold more efficiently ( $k_{obs} \approx 1.7 \text{ h}^{-1}$ ) than DNAzymes of the original design. The BivDz3 variant showed the highest specificity ( $F(s) > 0.80$ ) while maintaining high efficiency ( $k_{obs} \approx 1.5 \text{ h}^{-1}$ ). A BivDz-based construct of antisense oligonucleotides, BivASO(t), cleaved ~35% of RNA in 20 min with high specificity ( $F(s) > 0.70$ ). Allosteric BinDz constructs showed cleavage of folded RNA only in the presence of a genetic marker ( $TON = 0.3 \text{ h}^{-1}$ ,  $F(s) = 0.72$ ), while the presence of additional RNA-binding domains in the BinDM construct contributed to increased RNA cleavage efficiency and RNA binding specificity ( $TON = 0.4 \text{ h}^{-1}$ ,  $F(s) = 0.88$ ).