

Искусственные рибозимы «головка молотка»: дизайн и применение

М.А.Воробьева, А.С.Давыдова, А.Г.Веньямина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, факс (383)363–5153

Описаны свойства рибозимов, имеющих структуру вида «головка молотка». Рассмотрены различные рибозимные конструкции на основе модели «головка молотка» для направленного расщепления РНК. Представлены подходы к повышению устойчивости искусственных рибозимов в биологических средах, а также к регуляции каталитической активности рибозимов «головка молотка» с использованием молекул-эффекторов. Обсуждена проблема воздействия рибозимов на протяженные структурированные природные РНК. Рассмотрено применение искусственных рибозимов «головка молотка» в качестве ингибиторов экспрессии генов на уровне матричной РНК.

Библиография — 217 ссылок.

Оглавление

I. Введение	139
II. Строение и свойства <i>транс</i> -рибозима «головка молотка»	140
III. Создание искусственных рибозимов «головка молотка» для направленного расщепления РНК	142
IV. Применение рибозимов «головка молотка»	149
V. Заключение	153

I. Введение

Селективное ингибирование экспрессии определенных генов на уровне их матричной РНК (мРНК) является одной из актуальных задач молекулярной биологии, биотехнологии и фундаментальной медицины. В последние десятилетия интенсивно ведется поиск агентов, способных специфично взаимодействовать с определенными последовательностями мРНК, и их тестирование в качестве инструментов функциональной геномики и диагностики, а также лекарственных

препаратов, подавляющих экспрессию терапевтически значимых генов. В основе создания таких агентов — антисмысловых олигонуклеотидов, малых интерферирующих РНК и каталитических нуклеиновых кислот — лежит использование последовательностей НК, комплементарных определенным участкам выбранной мРНК-мишени.^{1–3} Одним из перспективных направлений в этой области является конструирование каталитических нуклеиновых кислот (НК-энзимов) — олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотидов с характерной вторичной структурой, способных высокоспецифично расщеплять РНК.^{4,5} Среди НК-энзимов особый интерес вызывают рибозимы типа «головка молотка».

Рибозимы, или каталитические РНК, были впервые открыты в лаборатории проф. Чеха⁶ в Университете Колорадо в 1982 г. Авторы показали, что предшественник рибосомальной РНК из *Tetrahymena thermophila* содержит интрон, способный осуществлять *in vitro* реакцию собственного отщепления без участия какого-либо белка или внешнего источника энергии. Вскоре после этого группой авторов под руководством Альтмана⁷ из Йельского университета было показано, что M1 РНК, входящая в состав РНКазы Р из *Escherichia coli*, осуществляет процессинг предшественника транспортной (тРНК) без участия белкового кофактора. В 1989 г. за открытие каталитических функций РНК Чех и Альтман получили Нобелевскую премию по химии.

В настоящее время известно несколько типов природных РНК, обладающих РНК-гидролизующей активностью (более подробно см. обзоры^{8,9}): интроны I группы, интроны II группы, РНК-субъединица РНКазы Р, РНК дельта-вируса

М.А.Воробьева. Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН.

Телефон: (383)363–5129, e-mail: kuzn@niboch.nsc.ru

А.С.Давыдова. Младший научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (383)363–5129, e-mail: anna.privalova@niboch.nsc.ru

Область научных интересов авторов: химия нуклеиновых кислот; олигонуклеотиды, их аналоги и производные; каталитические нуклеиновые кислоты; аптамеры.

А.Г.Веньямина. Кандидат химических наук, доцент, заведующая той же лабораторией. Телефон: (383)363–5129, e-mail: ven@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: химия нуклеиновых кислот, олигонуклеотиды, их аналоги и производные; каталитические нуклеиновые кислоты; аптамеры; малые интерферирующие РНК; флуоресцентные пробы — синтез, свойства и взаимодействие с биополимерами.

Дата поступления 2 февраля 2010 г.

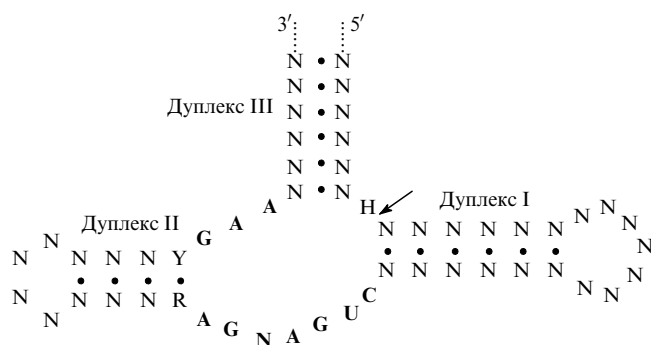


Рис. 1. Вторичная структура каталитического мотива «головка молотка».

Здесь и далее приняты обозначения: R — пуриновый рибонуклеотид, Y — пиримидиновый рибонуклеотид, N — любой рибонуклеотид, Н — любой рибонуклеотид, кроме G; жирным шрифтом выделены консервативные нуклеотиды; стрелкой указана расщепляемая межнауклеотидная связь.

гепатита, рибозим сателлита Варкуда, рибозим *glmS*, шпильчатый (hairpin) рибозим и рибозим «головка молотка». Открытие каталитических свойств РНК стимулировало развитие работ по конструированию на основе природных последовательностей искусственных рибозимов, способных направленно расщеплять выбранную молекулу РНК. С этой точки зрения наиболее перспективными являются «короткие» рибозимы, длина которых не превышает 100 нуклеотидных звеньев, — рибозимы вируса гепатита D, шпильчатый рибозим и рибозим «головка молотка». Каталитический мотив «головка молотка», длина которого составляет около 50 нуклеотидов (рис. 1), первоначально был найден в РНК некоторых вирусов растений,¹⁰ а затем обнаружен у земноводных, насекомых, плоских червей и даже млекопитающих, а также получен независимо методом селекции *in vitro*.^{11–13} Это дает основания рассматривать рибозим «головка молотка» как наиболее «эволюционно древнюю» каталитическую РНК.

При сравнительно небольшой длине олигонуклеотидной цепи рибозим «головка молотка» обладает высокой каталитической активностью, а строение его таково, что позволяет разделить молекулу на консервативную «каталитическую» и вариативную «субстратную» части. Сочетание этих свойств

сделало его удобным объектом изучения и основой для создания искусственных рибозимов. Данный обзор посвящен конструированию рибозимов на основе модели «головка молотка», их свойствам и применению в качестве селективных агентов для направленного расщепления РНК.

II. Строение и свойства *транс*-рибозима «головка молотка»

Начало конструированию искусственных рибозимов «головка молотка», способных осуществлять *транс*-расщепление, т.е. расщеплять другие молекулы РНК, было положено Уленбеком.¹⁴ Домен «головка молотка» был разделен на два отдельных частично комплементарных олигомера таким образом, что рибозим и субстрат образовывали дуплексы I и II (так называемый I/II-формат). Однако при этом субстрат содержал консервативную последовательность, что не позволило использовать данный способ конструирования как универсальный.

Более удачным оказался способ, предложенный в работе¹⁵: рибозим и субстрат образуют дуплексы I и III (I/III-формат), а дуплекс и петля II входят в состав рибозима. В качестве субстрата авторы выделили ту часть природной последовательности, которая почти не содержала консервативных рибонуклеотидов (рис. 2). Это позволило перейти от нескольких уникальных примеров каталитических последовательностей к универсальным рибозимам, способным расщеплять широкий спектр последовательностей РНК, и стало импульсом для огромного числа работ, посвященных созданию рибозимов «головка молотка» для направленного расщепления РНК.

Необходимо отметить, что при разделении «головки молотка» на рибозимную и субстратную части описанным выше способом рибозим «утратил» петлю, закрывавшую дуплекс I (ср. рис. 1 и 2). Недавно было обнаружено, что петля I играет более важную роль, чем считалось ранее: ее взаимодействие с петлей II способствует образованию выгодной для расщепления конформации¹⁷ и более быстрому расщеплению фосфодиэфирной связи.^{18–21} В последние годы было опубликовано несколько работ по созданию *транс*-рибозимов, в которых дуплекс I содержит петлю I или имитирующее ее выпетливание,^{22,23} и показано, что они способны расщеплять РНК при пониженных концентрациях Mg^{2+} и могут быть использованы для расщепления как коротких, так и протяженных фрагментов РНК.^{23,24} Однако

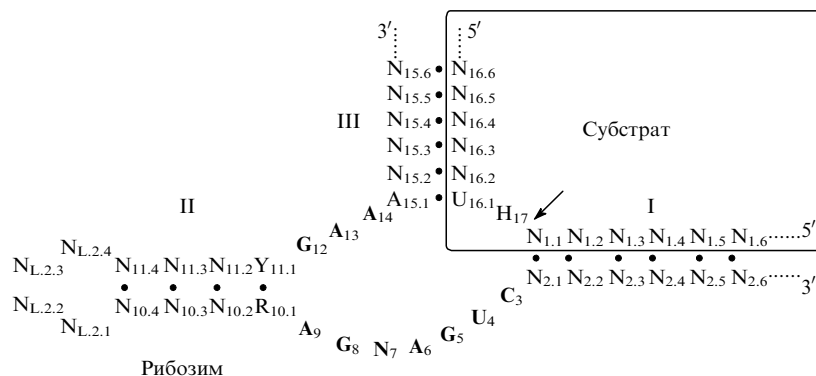


Рис. 2. Разделение домена «головка молотка» на рибозим и субстрат способом, предложенным Хазеллоффом и Герлахом.¹⁵ Нуклеотиды рибозима и РНК-субстрата пронумерованы согласно общепринятой номенклатуре.¹⁶

такие «расширенные» (extended) *транс*-рибозимы пока не получили широкого распространения, и наиболее популярным вариантом универсального *транс*-рибозима в настоящее время остается модель Хазеллоффа – Герлаха без петли I.

1. Субстратная специфичность рибозима

Рибозим «головка молотка» способен расщеплять РНК после триплета 5'-NUH-3', где N — любой из четырех рибонуклеотидов, Н — любой рибонуклеотид, кроме G.^{25–28} Наличие в положении 17 остатка гуанозина приводит к образованию комплементарной пары G₁₇C₃ (см.²⁹) и инактивации рибозима. Для триплетов 5'-NUH-3' эффективность расщепления убывает в ряду AUC, GUC > GUA, AUA, CUC > AUU, UUC, UUA > GUU, CUA > UUU, CUU, при этом константа скорости расщепления фосфодиэфирной связи для «лучших» и «худших» триплетов отличается примерно в 40 раз. Как было показано в работе³⁰, в среднем положении триплета могут находиться также цитозин и аденозин. Константа расщепления в этих случаях понижена примерно на порядок по сравнению с триплетом GUC. Замена аденозина в положении 15.1 на инозин дает возможность расщепления связи, находящейся после триплета NCH, практически с той же эффективностью, что и связи после триплета NUH, благодаря сходной геометрии А-У и I-С пар в рибозим-субстратном комплексе.³¹ Опираясь на приведенные выше данные, можно конструировать рибозимы «головка молотка» для расщепления различных последовательностей РНК.

2. Пространственная структура рибозим-субстратного комплекса. Механизм расщепления РНК

Структуру рибозима «головка молотка» в комплексе с РНК-субстратом можно описать как стык трех двойных спиралей (three-way junction). Большинство консервативных нуклеотидов находятся в неспаренных участках и необходимы для формирования характерной структуры каталитического кода. Замены консервативных нуклеотидов в положениях 3–10 и 11–14 (рис. 3) приводят к практически полной инактивации рибозима, замена уридина в положении 7 на любой другой нуклеотид снижает константу расщепления в 2–5 раз.²⁵

По данным рентгеноструктурного анализа, в кристалле комплекс рибозима с нерасщепляемым РНК-субстратом, содержащим в сайте расщепления дезокси- или 2'-O-метил-

рибонуклеотид, имеет Y-форму, причем дуплексы II и III расположены коаксиально и образуют единую псевдо-А-спираль, а дуплекс I находится под острым углом к дуплексу II (см. обзоры^{32–34}) (см. рис. 3). Как было показано Лилли с соавт.,^{34–36} образование Y-формы рибозим-субстратного комплекса происходит в две стадии, и для него необходимо наличие ионов двухвалентных металлов, как правило Mg²⁺.

Гидролиз фосфодиэфирной связи рибозимом «головка молотка» происходит при линейной (*in line*) ориентации 2'-O-, P- и 3'-O-атомов по S_N2-механизму с обращением конфигурации заместителей у атома фосфора. Механизм включает в себя атаку атома фосфора 2'-ОН-группой с образованием пентакоординированного переходного состояния и последующее высвобождение 5'-гидроксильной группы.^{33,37} Продукты расщепления содержат 2',3'-циклофосфатный фрагмент и 5'-гидроксильную группу. Механизм расщепления РНК рибозимом «головка молотка» был предметом интенсивного изучения на протяжении почти двух десятилетий. Проблема состояла в несоответствии между результатами рентгеноструктурного анализа и биохимическими данными о конкретных функциональных группах в составе рибозима, необходимых для расщепления РНК (см. обзоры^{9,38,39}).

Разрешить эти противоречия помогли недавние исследования «расширенных» *цис*-рибозимов, в частности их рентгеноструктурный анализ.^{17,40} Структура «расширенных» рибозимов в кристалле отличается от структуры, полученной для «минимальных» рибозимов, и хорошо согласуется с полученными ранее биохимическими данными. На основании этих результатов был сделан вывод о том, что структура «расширенных» рибозимов близка к переходному состоянию реакции, в то время как комплекс «минимального» рибозима с субстратом, структура которого фиксируется методом рентгеноструктурного анализа, является неактивным. Для расщепления РНК ему необходима дополнительная конформационная перестройка с образованием короткоживущей активной формы.^{41,42} Установлено, что непосредственное участие в катализе принимают остатки гуанозина G₈ и G₁₂. Атом N(1) остатка G₁₂ выступает в роли основания и способствует депротонированию атома кислорода в положении 2',^{17,43} а 2'-ОН-группа остатка G₈ участвует в протонировании уходящего 5'-оксаниона.⁴⁴ При этом необходимая для данной реакции степень кислотности 2'-ОН-группы остатка G₈ достигается за счет координации с Mg²⁺ или другим двухвалентным катионом.⁴⁴ В общем виде механизм кислотно-основного катализа расщепления фосфодиэфирной связи рибозимом «головка молотка» представлен на схеме 1.

3. Кинетическая схема расщепления РНК рибозимом «головка молотка»

Минимальная кинетическая схема расщепления РНК рибозимом «головка молотка» включает в себя следующие стадии (схема 2):⁴⁵

- 1) образование рибозим-субстратного комплекса E · S;
- 2) расщепление фосфодиэфирной связи с образованием 5'-продукта P1, содержащего 2',3'-циклофосфатный фрагмент, и 3'-продукта P2, содержащего 5'-гидроксильную группу, которые остаются в комплексе с рибозимом — E · P1 · P2;
- 3) поочередное отщепление продуктов от рибозима различными способами.

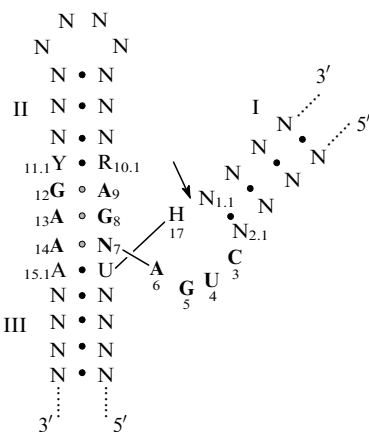
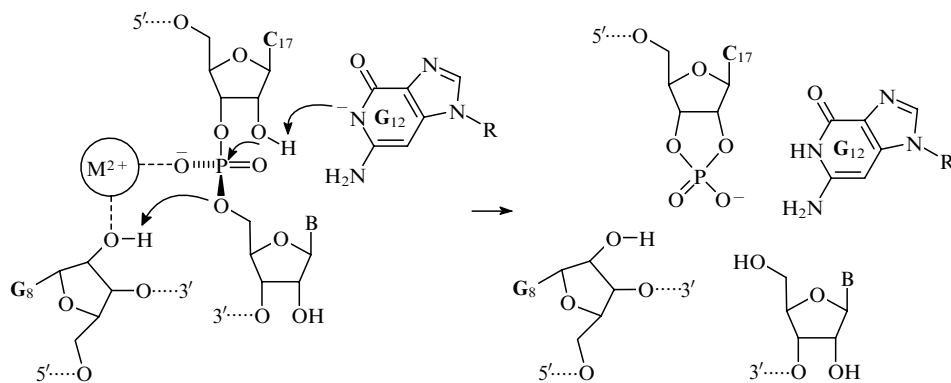


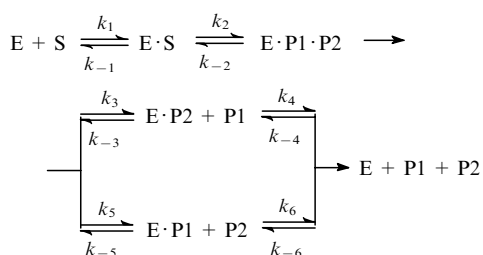
Рис. 3. Y-Форма рибозим-субстратного комплекса.³²

Схема 1



B — основание.

Схема 2



E — рибозим, S — РНК-субстрат, P1 — 5'-концевой продукт, P2 — 3'-концевой продукт расщепления.

Все стадии каталитического цикла являются обратимыми, однако скорость прямых реакций намного превосходит скорость обратных. Значение константы скорости расщепления (k_2) фосфодиэфирной связи рибозимом составляет в среднем 1 мин^{-1} в стандартных условиях (pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 25°C), а константа скорости обратной реакции (лигирования) (k_{-2}) в 20–100 раз ниже. Величины остальных констант зависят от стабильности дуплексов с субстратом и продуктами расщепления и могут быть как измерены непосредственно, так и оценены исходя из термодинамических параметров образования дуплексов РНК–РНК.⁴⁵ Для приближенного описания рибозимной кинетики можно использовать схему Михаэлиса–Ментен, что дает возможность сравнивать каталитические свойства рибозимов, опираясь на значения K_M и k_{cat} . Типичные значения K_M для рибозимов «головка молотка» лежат в пределах $0.01–1.00 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$, а характерное значение k_{cat} составляет 1 мин^{-1} (см.⁴⁵).

III. Создание искусственных рибозимов «головка молотка» для направленного расщепления РНК

При конструировании синтетических рибозимов необходимо учитывать такие требования, как оптимальная длина олигонуклеотидной цепи, селективное расщепление РНК-мишени, высокая каталитическая активность, стабильность рибозима в условиях внутриклеточной среды. Далее мы рассмотрим известные на сегодняшний день подходы к конструированию рибозимов «головка молотка», разработанные с учетом этих требований.

1. Минимизация длины рибозима «головка молотка». Минизимы и максимизы

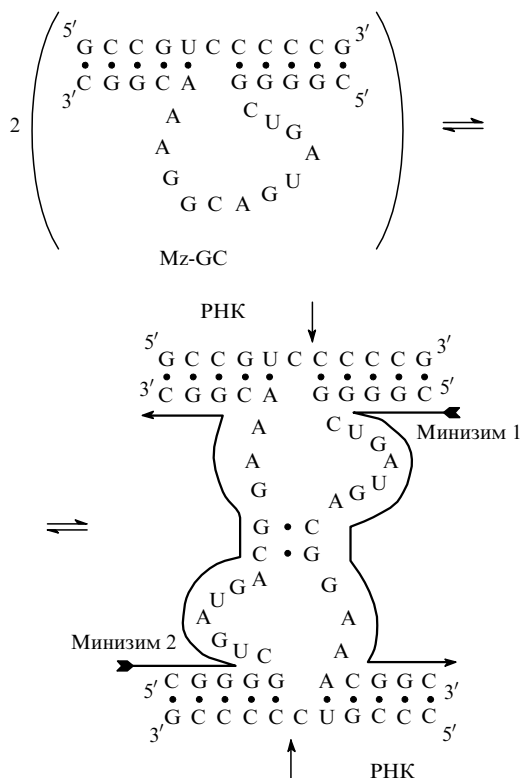
Для структурных исследований рибозимов «головка молотка» (методами спектроскопии ЯМР, рентгеноструктурного анализа), а также для клинических испытаний необходимы значительные количества рибозимов. Поэтому одна из задач, которую приходится решать при их конструировании, состоит в уменьшении длины олигонуклеотидной цепи. Это, с одной стороны, позволяет упростить и удешевить синтез, а с другой — снизить суммарный отрицательный заряд и облегчить тем самым проникновение рибозима в клетку. Укорачивать можно только неконсервативные области рибозима — дуплексы I и III, а также дуплекс II и замыкающую его петлю. Оптимальная длина субстратузнающих участков, обеспечивающая как эффективное связывание с РНК, так и быстрое элиминирование продуктов расщепления от рибозима, для разных рибозимов может быть различной и составляет 5–7 рибонуклеотидов для каждого участка.^{46, 47}

Основным подходом к уменьшению длины рибозимов является снижение числа неконсервативных нуклеотидов в дуплексе II и замыкающей его петле. Сконструированные по этому принципу рибозимы получили название минизимов (см. обзоры^{48, 49} и цитируемые в них работы). Наиболее удачными оказались химерные минизимы, в которых дуплекс и петля II были заменены линкером из четырех дезоксирибонуклеотидов одновременно с введением дезоксирибонуклеотидов в субстрат-связывающие участки. Расщепление протяженного РНК-транскрипта химерными минизимами протекало даже более эффективно, чем их полноразмерными аналогами.⁵⁰ Химерный минизим, комплементарный участку мРНК интерлейкина-2 человека, ингибировал экспрессию этого белка в культуре клеток практически с той же эффективностью, что и полноразмерный рибозим.⁵¹ Для конструирования минизимов используют также метод селекции *in vitro*. При этом каталитический кор рибозима остается неизменным, а варьируется состав укороченной линкерной олигонуклеотидной последовательности между G_{10.1} и C_{11.1}. С использованием этого подхода были найдены последовательности минизимов, обладающих высокой каталитической активностью при пониженной концентрации ионов магния.^{12, 52, 53}

Поскольку большинство нуклеотидов, входящих в состав дуплекса и петли II, являются неконсервативными, было предложено заменить этот участок ненуклеотидными вставками, введение которых позволило бы сократить число ста-

дий при синтезе (см. обзор⁴⁹ и цитируемые в нем работы). Наиболее эффективными из них были рибозимы, содержащие олигоэтиленгликолевые линкеры, «длина» которых составляла не менее 13 атомов. Активность таких конструкций была практически такой же, как у немодифицированных рибозимов; в ряде случаев модифицированные рибозимы были даже эффективнее, однако такие исследования не получили дальнейшего развития.

Интересным вариантом конструирования минизимов являются минизимные димеры — максимизмы, описанные в работах Таиры и соавт.^{54–56} Ими были исследованы свойства серии минизимов, в которых дуплекс II и замыкающая его петля заменены линкерной последовательностью из 1–4 рибонуклеотидов. Два минизима с линкерами 5'-GCGC-3' (Mz-GCGC) и 5'-GC-3' (Mz-GC), обладали высокой каталитической активностью.⁵⁵ Оказалось, что они образуют димеры с общим дуплексом II (схема 3), каталитическая активность которых возрастает с увеличением числа комплементарных пар в этом дуплексе.



Димер может быть образован как молекулами одного и того же минизима, так и молекулами с различными линкерными последовательностями, комплементарными друг другу. Поскольку максимизмы способны расщеплять РНК по двум сайтам одновременно, их использование особенно выгодно в случае протяженных молекул РНК. Например, при расщеплении протяженного фрагмента *tat* мРНК ВИЧ-1 димер превосходил по эффективности полноразмерный рибозим.^{56–59} Способность связываться сразу с двумя последовательностями РНК была использована при создании аллостерически регулируемых максимизмов — гетеродимеров с одним активным центром, которые узнают два различных участка РНК и расщепляют РНК в одном из них.^{60–65}

Эта стратегия была эффективно использована при расщеплении *BCR/ABL* мРНК — продукта химерного гена

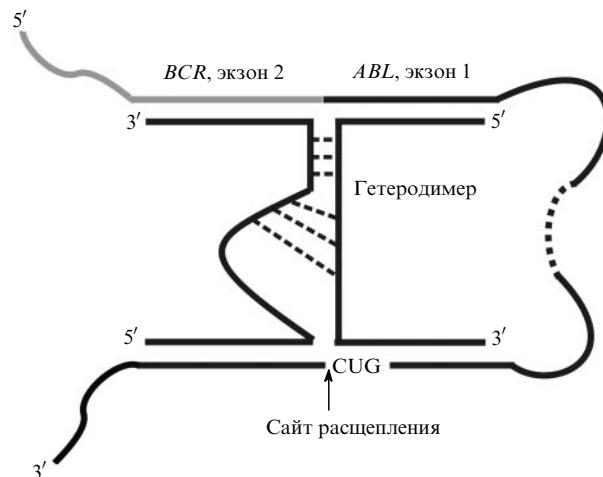


Рис. 4. Схематическое изображение гетеродимерного максимизма, направленного на химерную *BCR/ABL* мРНК.⁶⁰

BCR/ABL, возникающего в результате хромосомной транслокации и слияния генов *bcr* и *abl* (синдром филадельфийской хромосомы) (рис. 4). Участок «слияния» *BCR*- и *ABL*-частей в соответствующей мРНК не содержит триплетов 5'-NUH-3', а использование рибозимов к другим участкам *BCR/ABL* мРНК неизбежно будет приводить к расщеплению «нормальных» *BCR* мРНК или *ABL* мРНК. Гетеродимерный максимизм связывается как с сайтом «слияния» *BCR/ABL*, так и с участком, содержащим триплет 5'-GUC-3', после которого происходит расщепление. Было показано, что такие гетеродимеры селективно и с высокой эффективностью расщепляют *BCR/ABL* мРНК и селективно ингибируют экспрессию гена *bcr/abl*, при этом доставка компонентов димера в клетку осуществлялась эндогенным способом, путем введения специально сконструированных плазмид.

2. Бинарные рибозимы

Разделение рибозима на два отдельных частично комплементарных олигонуклеотида позволяет существенно упростить синтез и выделение рибозимных конструкций. В работах Оцуки с соавт.^{66–69} описаны дизайн и свойства рибозимов, разделенных на два фрагмента в области петли II. Двухкомпонентные рибозимы были способны расщеплять как короткие, так и протяженные РНК-субстраты, но уступали в эффективности расщепления полноразмерным аналогам, и в дальнейшем авторы не развивали этот интересный подход к конструированию рибозимов для направленного расщепления РНК. В работах Веняминой с соавт.^{70–75} был предложен другой подход к конструированию бинарных рибозимов «головка молотка». Такой рибозим состоит из двух олигонуклеотидов, образующих после «сборки» на РНК-субстрате структуру «головки молотка» с общим дуплексом II без петли (рис. 5).

В условиях избытка по отношению к 19-звенному РНК-субстрату бинарный рибозим расщеплял его с той же эффективностью, что и полноразмерный аналог. Возможность варьирования концентрации каждого из компонентов рибозима позволяет использовать недостаток одного из компонентов по отношению к РНК при избытке или эквивалентном соотношении РНК: второй компонент. При этом концентрация бинарной конструкции в целом остается ниже концентрации РНК, а расщепление протекает более эффективно, чем

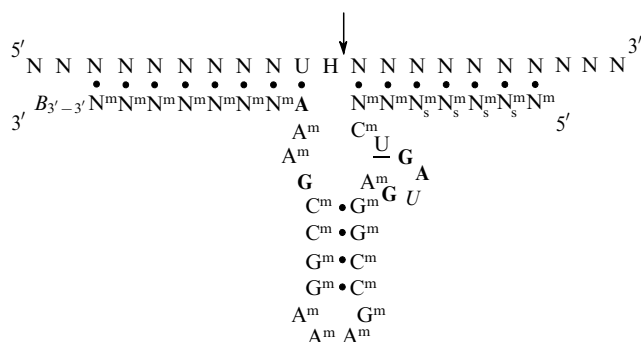


Рис. 6. Общая структура максимально модифицированных рибозимов.⁸¹

Здесь и далее: N^m — 2'-*O*-метилрибонуклеотид, $\underline{U}$ — 2'-аминоуридин или 2'-*C*-аллилуридин, U — 2'-аминоуридин или 2'-*O*-метилуридин, s — тиофосфатная связь, $B_{3'-3'}$ — остаток тимидина или 1,2-дидезоксирибозы, присоединенный 3'-3'-фосфодиэфирной связью.

мировать водородные связи, а дополнительная метильная группа в положении 2' является защитой от нуклеаз. Рибозим, содержащий 2'-*O*-метилрибонуклеотиды во всех неконсервативных положениях и 2'-*C*-метилуридин в положении 7, эффективно ингибировал экспрессию эстрогенового рецептора в культуре клеток.

Комбинированная стратегия модифицирования была использована Веняминой с соавт.^{72–75} для создания устойчивых к нуклеазам бинарных рибозимов. Модифицированные бинарные рибозимы содержали 2'-*O*-метилрибонуклеотиды во всех неконсервативных положениях и 2'-аминоуридин либо 2'-*O*-метилуридин в положениях 4 и 7 (рис. 7). Для защиты 3'-концов обоих компонентов был использован остаток тимидина, присоединенный 3' – 3'-фосфодиэфирной связью. Такое сочетание модификаций повысило их устойчивость в культуральной среде с сывороткой с 1 мин до 1 сут, при этом каталитическая активность полученных конструкций была равной или превышала активность полноразмерного рибозима при расщеплении как короткого РНК-субстрата, так и протяженного 190-звенного фрагмента MDR1 мРНК.

В работе⁸⁵ для повышения устойчивости полноразмерных и бинарных рибозимов в биологических средах, а также улучшения сродства к РНК в их состав вводили 2'-O,4'-C-

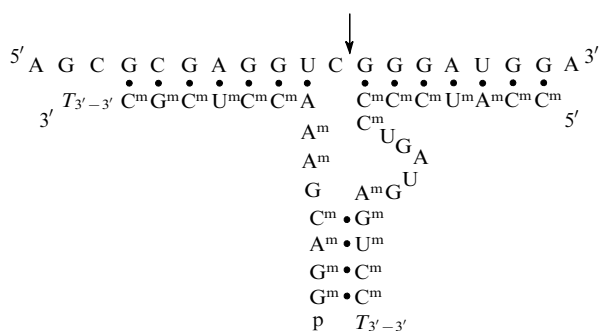
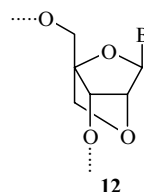


Рис. 7. Модифицированные бинарные рибозимы.⁷³
 $T_{3'}-3'$ — остаток тимидина, присоединенный $3'-3'$ -фосфодиэфирной связью.

метилендициклические нуклеотиды **12** (Locked Nucleic Acids, LNA).



Надо отметить, что во всех случаях созданные в этой работе модифицированные бинарные рибозимы (рис. 8,*b*) расщепляли РНК значительно менее эффективно, чем их полноразмерные аналоги (см. рис. 8,*a*). Для поиска оптимальных сочетаний компонентов бинарных рибозимов авторы использовали комбинаторный подход.

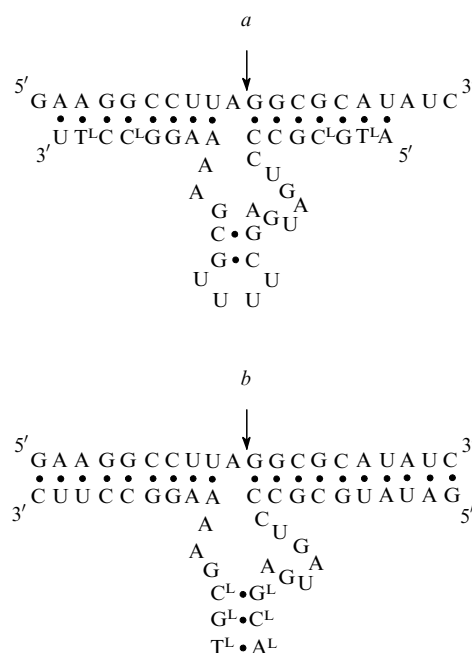


Рис. 8. Модифицированные полноразмерные (а) и бинарные (б) рибозимы, содержащие LNA-нуклеотиды (N^L).⁸⁵

4. Регуляция каталитической активности рибозимов с использованием эффекторов

Для применения рибозимов в сложных многокомпонентных молекулярно-биологических системах необходимо обеспечить их связывание с высокоструктурированной РНК-мишенью, а также иметь возможность регуляции каталитической активности рибозима в зависимости от его локального окружения. В настоящее время предложено несколько подходов к регуляции активности рибозимов, основанных на использовании дополнительных молекул-эффекторов («фасилитаторов», «хелперов», регуляторов). По принципу действия эффекторы можно разделить на три типа:

- 1) олигонуклеотиды-эффекторы, комплементарные РНК-субстрату;
- 2) аллостерические эффекторы, связывающиеся с рибозимом;
- 3) олигонуклеотиды-эффекторы, способные связываться одновременно с рибозимом и субстратом.

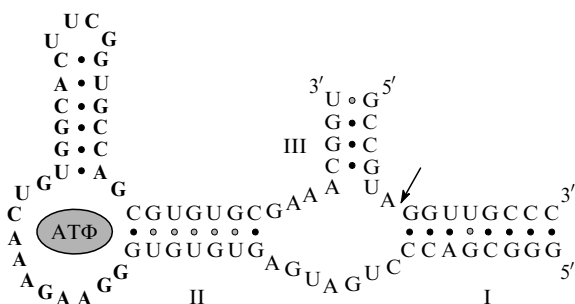


Рис. 10. АТФ-Зависимый аллостерический рибозим.⁹⁹

Жирным шрифтом выделена АТФ-связывающая аптамерная последовательность.

аптамеры в дуплексе II, причем стабильность этого дуплекса была искусственно понижена за счет наличия неканонических пар (см., например, рис. 10). В отсутствие эффектора активность этих рибозимов была очень низкой, а при связывании эффектора происходила стабилизация дуплекса II и переход рибозима в активное состояние. С использованием комбинированного подхода были созданы¹⁰⁷ рибозимы, способные расщеплять РНК в присутствии кофеина или аспартама; на их основе были получены флуоресцентные сенсоры, позволяющие детектировать эти молекулы в растворе. Интересный вариант фотоактивируемого аллостерического рибозима описан в работе¹⁰⁸: полученный при помощи рационального дизайна рибозим активируется в присутствии одного из изомеров дигидропирена. Облучение светом в видимой области ($\lambda > 400$ нм) приводит к обратимой изомеризации «активатора» и «выключает» рибозим, а облучение УФ-светом ($\lambda < 300$ нм) «включает» его снова.

Для аллостерической регуляции каталитической активности рибозимов можно также использовать олигонуклеотиды. В работах^{109–111} нуклеотиды $G_{10,1}$ и $C_{11,1}$ были соединены линкерной олигонуклеотидной последовательностью, не способной образовывать дуплекс и петлю II и содержащей участок, комплементарный так называемому олигонуклеотиду-регулятору, или эффектору (рис. 11). В его отсутствие рибозим не обладал каталитической активностью, а после комплементарного связывания с эффектором происходило образование псевдоузла, заменяющего дуплекс II, и рибозим приобретал способность расщеплять РНК. В качестве эффекторов были использованы олигорибонуклеотиды и олиго(2'-O-метилрибонуклеотиды), причем в последнем случае активность рибозима была выше.

В работах^{112,113} был предложен другой подход к конструированию аллостерических рибозимов, активирующихся олигонуклеотидом, — TRAP-дизайн (TRAP — Targeted Ribozyme-Attenuated Probe). В этом случае в состав рибозима входила вспомогательная последовательность — «аттенуатор», — присоединенная к каталитическому кору через линкерную последовательность. В отсутствие эффектора «аттенуатор» связывается с каталитическим кором и инактивирует рибозим. Олигонуклеотид-эффектор связывается с линкерной последовательностью, при этом дуплекс «аттенуатора» с каталитическим кором разрушается, и рибозим переходит в активное состояние. Способность рибозимов расщеплять РНК только в присутствии олигонуклеотида-эффектора определенной последовательности может быть использована для определения РНК в диагностических целях или присутствия в клетке чужеродных РНК. Так, после связывания с «аттенуатором» — определенной последовательностью вирусной РНК или РНК онкогена, рибозим способен расщеплять мРНК репортерного гена.¹¹²

Таким образом, возможность аллостерической регуляции рибозимов «головка молотка» эффекторами различной природы, связывающимися с рибозимом вне активного центра, открывает путь к конструированию рибозимов-биосенсоров, специфично реагирующих на наличие в среде определенных молекул.

в. Олигонуклеотиды-эффекторы, способные одновременно связываться с НК-энзимом и субстратом

Третий класс эффекторов представлен олигонуклеотидами, способными одновременно связываться и с рибозимом, и с РНК. Такой подход впервые был предложен в работе¹¹⁴ для ДНКзима «10–23», а затем адаптирован для регуляции активности рибозима «головка молотка».¹¹⁵ Рибозимы содержали окта- и тринуклеотидные субстратсвязывающие домены и олигодезоксирибонуклеотид-эффектор, образующий шесть комплементарных пар с 3'-концевым доменом рибозима и шесть пар — с РНК-субстратом (рис. 12,а).

Дальнейшим развитием этого подхода было конструирование нового рибозима, регулируемого флавиномононуклеотидом¹¹⁶ (рис. 12,б). Вместо бинарной конструкции, состоящей из рибозима и эффектора, в состав 3'-субстратсвязывающего домена была введена единая ФМН-связывающая аптамерная последовательность; добавление ФМН на порядок увеличивало активность рибозима. Полученные конструкции схожи с описанными выше аллостерическими рибозимами, но в данном случае эффектор влияет на стадию ассоциации рибозим-субстратного комплекса, а не на обра-

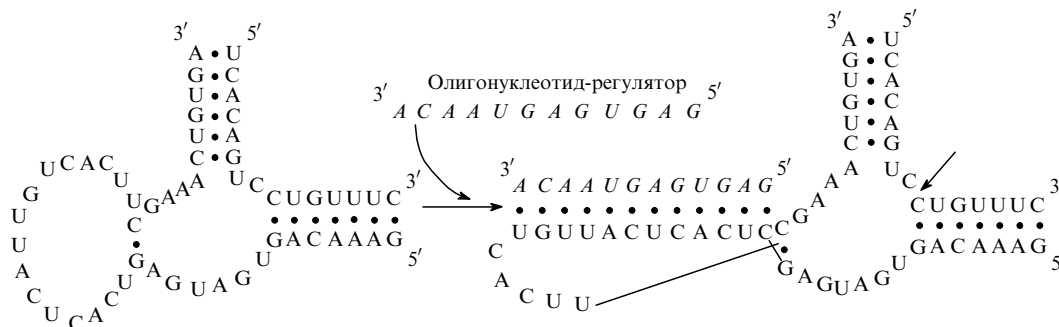


Рис. 11. Рибозим, аллостерически регулируемый олигонуклеотидом (обозначен курсивом).^{109–111}

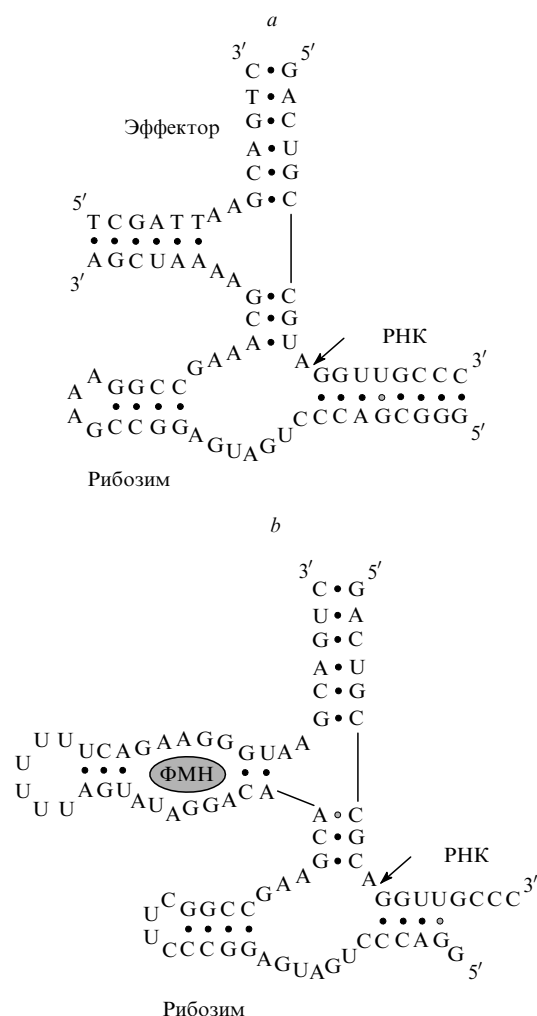


Рис. 12. Рибозим, регулируемый эффектором двойного типа действия¹¹⁵ (а), и созданный на его основе ФМН-зависимый рибозим¹¹⁶ (б).

зование активной конформации. При этом степень активации в присутствии эффектора была ниже, чем для обычных аллостерических рибозимов, однако, по мнению авторов, дальнейшая оптимизация структуры должна привести к созданию эффективных рибозимов с контролируемой каталитической активностью. Следует отметить, что этот подход пока не получил своего дальнейшего развития.

5. Подходы к увеличению эффективности расщепления рибозимами структурированных природных РНК

Основным направлением в использовании искусственных рибозимов «головка молотка» является селективное расщепление определенных природных мРНК для регуляции экспрессии соответствующих генов. При этом одной из главных проблем становится доступность выбранной последовательности РНК для расщепления. Поскольку мРНК обладают сложной вторичной и третичной структурой, число участков, доступных для связывания с рибозимами, весьма ограничено. Существуют два подхода к созданию рибозимов, способных эффективно расщеплять природные РНК. В рамках первого подхода сначала определяют сайты,

доступные для гибридизации и содержащие триплет 5'-NUH-3'. Для этого используют пробинг мРНК-транскриптов РНКазой Н с использованием набора олигонуклеотидов,^{117,118} выбор доступных для связывания участков на основе анализа вторичной структуры мРНК-мишени^{119,120} или анализ расщепления транскрипта мРНК библиотекой рибозимов со случайными последовательностями субстрат-связывающих участков.^{121–123} Надо отметить, что эти способы полностью не гарантируют того, что в клетке данные участки также будут доступными, поскольку полноразмерная мРНК в клетке может иметь отличающуюся от транскрипта вторичную и третичную структуру. Кроме того, в клетке мРНК находится в комплексе с белками, которые могут препятствовать связыванию с рибозимами.

Второй подход подразумевает создание рибозимных конструкций, способных взаимодействовать с выбранной последовательностью РНК независимо от ее вторичной и третичной структуры. Таира и соавт.^{124,125} предложили стратегию создания рибозимов для расщепления высокоструктурированных протяженных РНК, основанную на соединении рибозима «головка молотка» и РНК-геликазы — белка, обладающего способностью неспецифически связывать РНК, перемещаться по молекуле и разворачивать ее вторичную структуру. Была разработана система внутриклеточной экспрессии гибридных рибозимов, позволяющая получать транскрипт тРНК^{Val} с протяженным 3'-концом, включающим последовательность рибозима.¹²⁶ Присоединенная последовательность тРНК не снижала каталитической активности рибозима и повышала его стабильность к действию клеточных нуклеаз. Для активации РНК-геликазы в состав конструкции была введена СТЕ-последовательность РНК (СТЕ — Constitutive Transport Element). Принцип взаимодействия гибридных рибозимов с РНК представлен на рис. 13: СТЕ-последовательность взаимодействует с белком-адаптером, а он образует комплекс с РНК-геликазой. Образовавшийся комплекс «сканирует» мРНК, разворачивая ее вторичную структуру. После связывания рибозима с целевой последовательностью происходит расщепление РНК. Было показано, что такие гибридные рибозимы эффективно расщепляют мРНК в участках, недоступных для связывания с обычными рибозимами.^{124,125,128} Описано успешное использование библиотек гибридных рибозимов с рандомизированными РНК-узнающими участками для определения функциональных генов.^{129–134}

Еще один способ повышения эффективности расщепления структурированных РНК — увеличение длины одного из субстрат-связывающих участков рибозима.^{135–139} Такие конструкции получили название асимметричных рибозимов (рис. 14).

Асимметричный рибозим можно условно разделить на два функциональных домена — длинный фланкирующий участок, «разворачивающий» РНК-мишень, и домен, обеспечивающий расщепление, — каталитический кор с прилегающим к нему коротким фланкирующим участком. Можно видеть, что асимметричные рибозимы принципиально схожи с системой рибозим + олигонуклеотид-эффектор: одна из частей конструкции отвечает за «разворачивание» РНК, вторая — за расщепление. В работах^{140–142} было показано, что удлинение 3'-фланкирующего домена положительно влияет на активность асимметричного рибозима, при этом минимальная длина 5'-домена составляет три нуклеотида. Удлинение 5'-фланкирующего домена, наоборот, ухудшает расщепление. Как предполагают авторы работы¹⁴², протя-

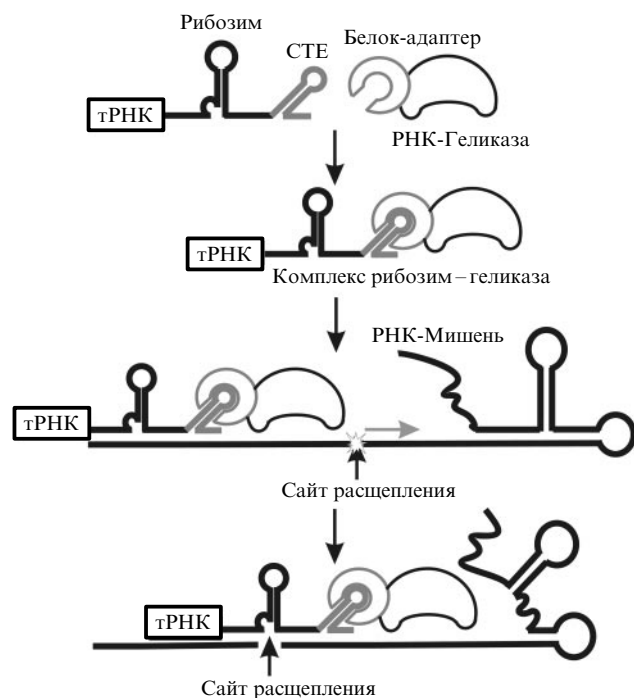


Рис. 13. Схематическое изображение расщепления мРНК гибридным рибозимом, способным активировать РНК-геликазу.¹²⁷

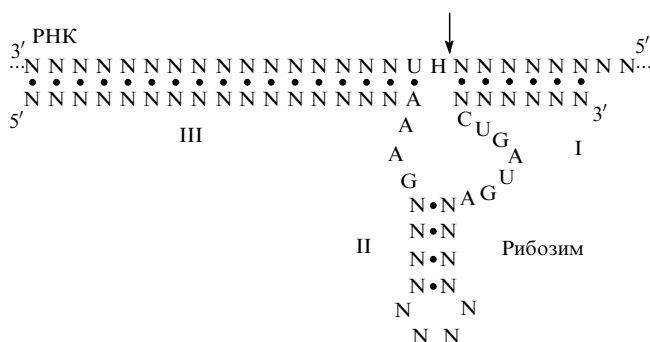


Рис. 14. Асимметричный рибозим «головка молотка».

женный стабильный дуплекс I, образованный 5'-фланкирующим доменом и РНК, замедляет переход рибозима в активную конформацию. Интересно, что эта закономерность характерна и для описанных выше олигонуклеотидов-эффекторов, связывающихся «встык» с одним из концов рибозима: эффекторы, стабилизовавшие дуплекс I, т.е. «удлинявшие» 5'-фланкирующий участок рибозима, также негативно влияли на его каталитическую активность. Показано, что асимметричные рибозимы способны эффективно расщеплять протяженные структурированные фрагменты AML1/MTG8 мРНК¹⁴⁰ и РНК ВИЧ-1;^{135, 136} введение в клетки плазмид, экспрессирующих эти рибозимы, приводило к значительному подавлению экспрессии химерного гена AML1/MTG8 или ингибированию репликации ВИЧ-1. Общим недостатком асимметричных рибозимов является образование прочного комплекса протяженного домена (с длиной до нескольких сотен нуклеотидов) с продуктами расщепления, в результате чего каждая молекула рибозима расщепляет только одну молекулу РНК.

Веньяминовой с соавт.^{143, 144} была предложена стратегия создания бинарных асимметричных рибозимов, основанная на физическом разделении «разворачивающего» и «расщепляющего» доменов. Были исследованы три асимметричных бинарных рибозима с гептануклеотидными «расщепляющими» 5'-доменами, различающиеся длиной «разворачивающего» 3'-концевого домена (от 10 до 20 нуклеотидов) (рис. 15). Для повышения биологической стабильности рибозимов был использован описанный выше набор модификаций (2'-O-метилрибонуклеотиды, 2'-аминоуридин, «инверсия» 3'-конца). Показано, что «разворачивающие» компоненты рибозимов быстро и эффективно образуют комплекс со структурированным 190-звенным фрагментом MDR1 мРНК. Благодаря этому асимметричные бинарные рибозимы расщепляли данный фрагмент РНК значительно более эффективно, чем их симметричный аналог. С увеличением длины «разворачивающего» домена эффективность расщепления увеличивалась, причем асимметричные бинарные рибозимы расщепляли РНК не только в условиях избытка, но и в условиях недостатка рибозима по отношению к РНК.

IV. Применение рибозимов «головка молотка»

На основе модели «головка молотка» можно создавать разнообразные рибозимные конструкции, адаптируя их под

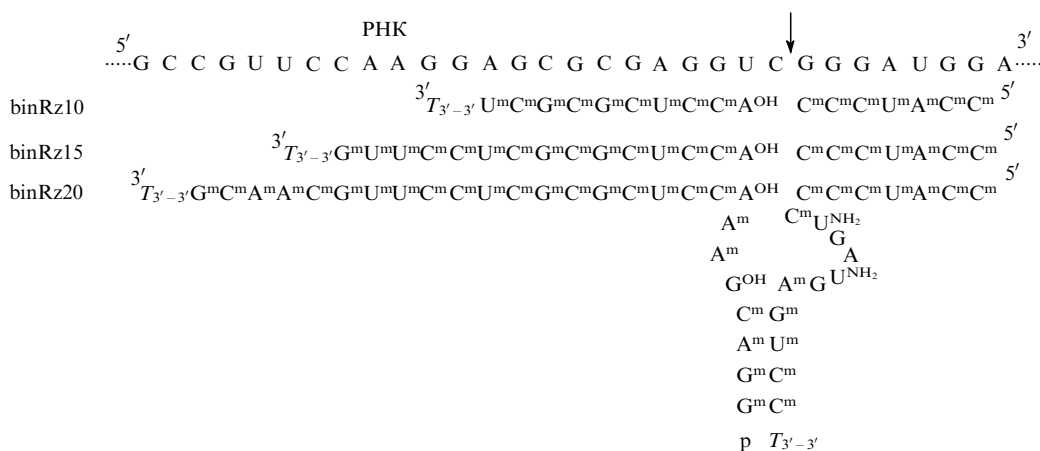


Рис. 15. Асимметричные бинарные рибозимы.¹⁴³ U^{NH2} — 2'-аминоуридин.

конкретные задачи. Благодаря этому искусственные рибозимы нашли широкое применение в качестве регуляторов экспрессии генов, как инструменты функциональной геномики и как агенты для воздействия на мРНК терапевтически значимых генов. Основным направлением в применении рибозимов стало подавление экспрессии генов, ответственных за развитие различных патологий — вирусных инфекций, онкологических и наследственных заболеваний. В данном разделе мы рассмотрим наиболее важные результаты, достигнутые в этой области.

Важной проблемой, возникающей при использовании рибозимов для ингибирования экспрессии генов, является их доставка в клетку. Существует два подхода к доставке рибозимов — эндогенный и экзогенный (см., например, обзор¹⁴⁵). Эндогенный способ подразумевает включение кодирующей рибозим последовательности ДНК в плазмиду или ретровирусный вектор. После трансфекции в клетку кодирующая конструкция встраивается в геном хозяина либо экспрессируется независимо, обеспечивая наработку рибозима, который затем взаимодействует с мРНК-мишенью. Преимуществом этого подхода является то, что введенная в клетку конструкция находится в ней постоянно, в результате происходит экспрессия все новых порций рибозима, и его концентрация в клетке поддерживается на постоянном уровне. При конструировании экспрессирующего вектора в состав рибозима могут быть введены последовательности РНК (тРНК, малые ядерные РНК и др.), обеспечивающие локализацию рибозима в том же компартменте, что и его мРНК-мишень.^{146–149} Недостатком эндогенной стратегии является введение в клетку чужеродного генетического материала, что небезопасно из-за возможного мутагенеза.

Для экзогенной доставки рибозим синтезируют химическим или ферментативным способом, а затем вводят в клетки. Использование такого способа доставки снимает проблему выбора вектора, но накладывает новые ограничения, связанные с проникновением рибозимов через клеточную мембрану и с их деградацией под действием клеточных нуклеаз. Для повышения устойчивости рибозимов к нуклеазам разработаны различные варианты химических модификаций, позволяющие существенно повысить стабильность рибозима и сохранить высокую каталитическую активность (см. выше). Чтобы обеспечить проникновение рибозима через клеточную мембрану, в большинстве случаев используют носители — катионные липиды, способные образовывать мицеллы, на внутренней поверхности которых находятся положительные заряды, взаимодействующие с отрицательными зарядами олигонуклеотидов; такие мицеллы затем транспортируются в клетку путем эндоцитоза.¹⁵⁰ Добавление к катионным липидам липидов-«хелперов» (например, холестерина) способствует высвобождению рибозимов из эндосом или лизосом.⁴ Катионные липиды хорошо зарекомендовали себя при использовании в культурах клеток, однако их применение на уровне живых организмов затруднено из-за токсичности и иммуностимулирующих свойств. В последние годы были разработаны альтернативные, биodeградируемые носители — дендримеры (разветвленные углеводы) и полимеры на основе молочной и гликолевой кислот.¹⁵¹ Для специфического воздействия на определенные типы клеток используют конъюгаты рибозимов с антителами или лигандами клеточных рецепторов.¹⁵² Интересно, что в некоторых случаях рибозимы, содержащие в положении 2' гидрофобные группы (*O*-метильную и *O*-аллилную), достаточно эффективно про-

никали в клетки и без липида-носителя,^{153,154} однако этот эффект наблюдался только на уровне живых организмов, но не в культурах клеток.

Использование рибозимов «головка молотка» оказалось очень эффективным способом подавления экспрессии вирусных генов. При этом рибозимы воздействуют строго специфично только на зараженные вирусом клетки и подавляют экспрессию генов вируса, не влияя на РНК клетки-хозяина. Описано успешное применение рибозимов для подавления экспрессии вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (см. обзоры^{155,156}). В большинстве случаев для этого были использованы эндогенные рибозимы. В качестве мишеней для рибозимов выступали гены *env*, *tat*, *pro* и *rev*, а также длинные 5'-концевые повторы (5'-LTR) вирусной РНК. Для дополнительного повышения эффективности воздействия на ВИЧ-1 было предложено использовать «мультимерные» рибозимы: плазида или вектор кодирует сразу несколько рибозимов, направленных на различные участки мРНК-мишени. Полученный в результате рибозимный транскрипт может затем выступать как единая молекула (полирибозим)^{155,157–159} или претерпевать аутосплайсинг с образованием нескольких отдельных рибозимов.^{160,161} По данным работ^{162–164}, эндогенные анти-ВИЧ рибозимы, отобранные по результатам исследований в культурах клеток, успешно прошли фазу I клинических испытаний. Сообщается также о рибозимах, которые прошли фазу II клинических испытаний: эндогенно экспрессируемый рибозим OZ1 (компания Johnson and Johnson), направленный на высококонсервативный участок перекрывания рамок считывания генов *vpr* и *tat*¹⁶⁵ (рис. 16) и мультимерный рибозим производства компании Ribozyome, направленный на гены *tat* и *rev*.¹⁶⁷

Для подавления ВИЧ-инфекции был предложен также комбинированный подход — введение в клетки векторов, которые кодируют различные конструкции на основе РНК (рибозимы «головка молотка», малые шпилечные РНК (shРНК), РНК-«ловушки» (RNA decoys)), «нацеленные» на ингибирование разных стадий жизненного цикла вируса.¹⁶⁸ Так, авторами работ^{169,170} был разработан лентивирусный вектор, кодирующий три перечисленных конструкции, и

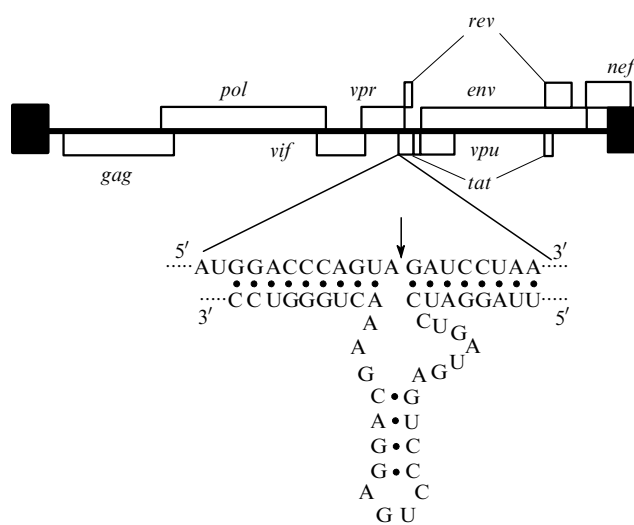


Рис. 16. Схематическое изображение генома ВИЧ-1 и нуклеотидная последовательность участка, на который направлен рибозим OZ1.^{165,166}

показано, что его введение в клетки делает их устойчивыми к заражению вирусом иммунодефицита. Более того, стволовые клетки, трансфицированные таким вектором, после введения их ВИЧ-инфицированным мышам были способны дифференцироваться в нормальные Т-клетки, также устойчивые к заражению вирусом.¹⁷⁰ Аналогичный подход был использован в работе¹⁷¹: совместное использование экзогенно доставленных в клетки рибозимов «головка молотка» и ДНКзимов «10–23» приводило к более эффективному ингибированию экспрессии вирусных генов, чем использование этих агентов по отдельности.

Изучалась также возможность использовать рибозимы «головка молотка» для подавления развития вируса гепатита С. Были исследованы как эндогенные,¹⁷² так и экзогенные рибозимы, однако в этом случае более удачным оказалось применение экзогенных химически синтезированных рибозимов, содержащих ряд модификаций — «инверсию» 3'-конца, замену большей части рибонуклеотидов их 2'-О-метильными аналогами, а части фосфодиэфирных связей — тиофосфатными. В культуре клеток степень ингибирования развития вируса рибозимами, направленными на 5'-нетранслируемую область вирусной РНК, составила от 50 до 90%.¹⁷³ На основании полученных данных в качестве терапевтического препарата был выбран наиболее эффективный из этих рибозимов — HEPTAZYME™ (компания Ribozyme Pharmaceuticals), который прошел две стадии клинических испытаний.⁸¹ Однако в 2002 г. было решено прекратить испытания, так как HEPTAZYME проявлял высокую активность только у 10% пациентов.¹⁷⁴ Методом селекции *in vitro* были получены химерные конструкции, состоящие из рибозима, направленного на IRES-элемент РНК гепатита С, и аптамера, специфически связывающего один из доменов IRES-элемента.¹⁷⁵ Показано, что в составе сложной конструкции и рибозим, и аптамер сохраняли свои функции, при этом наблюдалось ингибирование IRES-зависимой трансляции *in vitro*.

Описано использование рибозимов для ингибирования экспрессии вируса гепатита В. Эндогенные рибозимные конструкции эффективно подавляли развитие вируса в клеточном экстракте, однако в культуре клеток были неактивны.¹⁷⁶ Химерные минизимы, экзогенно введенные в культуру клеток, оказались эффективными ингибиторами экспрессии вируса.¹⁷⁷ Показано также, что синтетические 2'-модифицированные рибозимы способны ингибировать вирус гепатита В не только в культуре клеток, но и на уровне организмов.¹⁷⁸ Наиболее эффективный из этих рибозимов — HepBzyme (компания siRNA Therapeutics) (рис. 17,а) — проходит клинические испытания.^{167, 180}

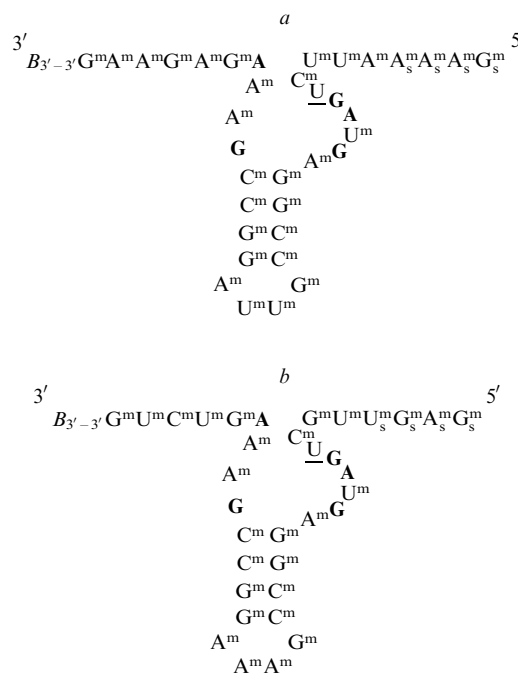


Рис. 17. Синтетические модифицированные рибозимы HepBzyme¹⁷⁸ (а) и ANGIOZYME¹⁷⁹ (b).

U — 2'-С-аллилуридин, B_{3'-3'} — остаток 1,2-дидезоксирибозы, присоединенный 3'-3'-фосфодиэфирной связью.

Банерджи с соавт. предложили использовать химерные конструкции, состоящие из siРНК и рибозима (рис. 18), для подавления экспрессии гена Х вируса гепатита В.¹⁸¹ Предложенные конструкции подвергались расщеплению в клеточных экстрактах с образованием независимых молекул рибозима и siРНК, ингибирующих экспрессию гена Х как на уровне мРНК, так и на уровне белка НВх.

Экзогенные химерные рибозимы, содержащие в неконсервативных положениях дезоксирибонуклеотиды, эффективно подавляли экспрессию вируса атипичной пневмонии SARS в культуре клеток.¹⁸² Показано также, что эндогенно введенные в клетки с использованием ретровирусного вектора рибозимы ингибировали экспрессию вируса лихорадки Денге.¹⁸³ В работе¹⁸⁴ описан аденовирусный вектор для эндогенной наработки рибозима, направленного на РНК вируса простого герпеса типа I. Показано, что его использо-

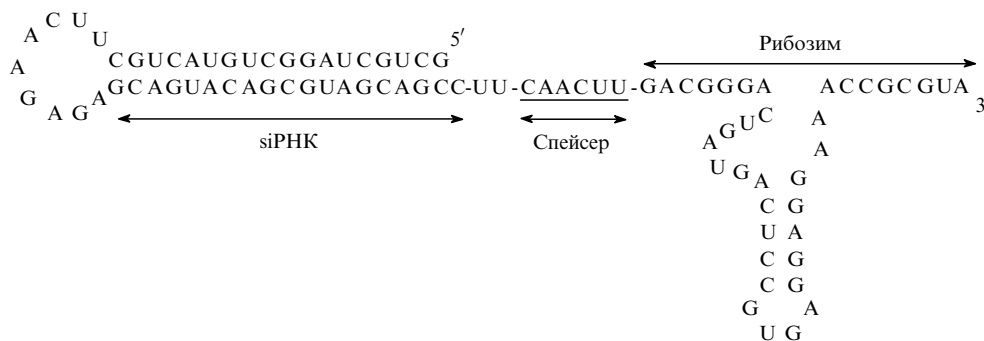


Рис. 18. «Гибридная» конструкция рибозим + siРНК, направленная на мРНК гена Х вируса гепатита В.¹⁸¹

вание эффективно защищает мышей от герпетической инфекции.

Другим быстро развивающимся направлением в использовании рибозимов «головка молотка» является ингибирование развития злокачественных опухолей. В качестве мишеней в этом случае выступают мРНК различных семейств генов, нарушения экспрессии которых ведут к злокачественному перерождению клетки. Среди них можно упомянуть следующие:

— мРНК онкогенов, участвующих в контроле клеточного роста и пролиферации. Одной из популярных мишеней среди онкогенов являются гены семейства *ras*, для которых характерен высокий уровень мутаций в кодирующей области. Конструирование рибозимов, направленных на мутантные РНК, позволяет специфично ингибировать экспрессию *ras*-генов в злокачественных клетках, не изменяя при этом уровень их экспрессии в нормальных клетках. Описано успешное использование рибозимов, направленных на мРНК генов *N-ras*,¹⁸⁵ *H-ras*¹⁸⁶ и *K-ras*,¹⁸⁷ для обращения злокачественного фенотипа в культурах клеток. В качестве онкогенов-мишеней выступают также гены тирозинкиназ *c-erb*, *c-met* и *RET* и фактора транскрипции *c-myc*.^{166, 188} Сконструирован эндогенно экспрессируемый рибозим, направленный на мРНК ингибитора фактора транскрипции NF-κB и показано, что его использование подавляет у мышей инвазию меланомы и препятствует образованию метастазов.¹⁸⁹

— мРНК химерных генов *pml/rar*, *bcr/abl*, возникающих в результате хромосомных транслокаций. Для селективного расщепления химерных мРНК используют эндогенно экспрессируемые рибозимы, направленные на участок слияния двух генов (см. раздел III.1); было показано успешное использование таких рибозимов для ингибирования экспрессии химерных генов и подавления развития лейкемии у животных.^{61, 65, 166}

— мРНК генов, участвующих в регуляции апоптоза (*bcl-2*, ген белка сурвивина). Подавление экспрессии этих генов с использованием рибозимов индуцирует апоптоз опухолевых клеток и повышает их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам и радиотерапии.^{166, 188, 190–192} В работе¹⁹³ описан интересный вариант доставки рибозима, направленного на мРНК сурвивина, в клетки с использованием РНК-вектора на основе РНК фага φ29. При включении рибозима в состав фаговой РНК сохранялась его способность расщеплять мРНК-мишень, при этом высокоструктурированный вектор защищал рибозим от действия клеточных нуклеаз. Такие конструкции эффективно ингибировали экспрессию сурвивина в культуре опухолевых клеток, вызывая их апоптоз. Разработан также аденовирусный вектор, кодирующий 4 рибозима, направленные на различные участки мРНК сурвивина, и показано, что его использование индуцирует апоптоз в культуре клеток и подавляет рост привитой мышам гепатоцеллюлярной карциномы человека.¹⁹⁴

— РНК теломерных повторов (hTR) и мРНК теломеразной обратной транскриптазы (hTERT), уровень экспрессии которых повышен в опухолевых клетках. Описано успешное использование химически синтезированных 2'-O-метил-содержащих рибозимов, направленных на РНК теломерных повторов для ингибирования теломеразной активности в культуре опухолевых клеток.¹⁹⁵ Эндогенно экспрессируемые рибозимы, направленные на эту же РНК, подавляли рост меланомы у мышей и препятствовали образованию метастазов.^{195, 196} Рибозимы, направленные на ген теломеразной

обратной транскриптазы, эффективно снижали теломеразную активность в клеточных культурах, подавляя рост опухолевых клеток и снижая их устойчивость к химиотерапевтическим агентам.^{188, 197}

— мРНК гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1*. Продукт гена *mdr1*, трансмембранный белок Р-гликопротеин, выводит из клеток лекарственные препараты, что препятствует химиотерапии опухолей. Показано, что экзогенно введенные (синтезированные химически или ферментативно)^{198–201} и эндогенные^{202–207} рибозимы снижают уровень экспрессии гена *mdr1* в культурах опухолевых клеток, восстанавливая их чувствительность к лекарственным препаратам, а также ингибируют экспрессию гена *mdr1* у животных.¹⁸⁸ В работе²⁰⁸ описано конструирование эндогенного «комплексного» полирибозима, направленного на мРНК нескольких генов множественной лекарственной устойчивости (MDR1, BCRP, MRP2). Показано, что введение в клетки вектора, кодирующего этот полирибозим, подавляет экспрессию соответствующих генов и восстанавливает устойчивость клеток к даунорубину.

— мРНК генов факторов роста кровеносных сосудов и их мембранных рецепторов (VEGF, Flt-1, KDR). Подавление экспрессии этих генов блокирует прорастание кровеносных сосудов в опухоль и тем самым останавливает ее рост. Наиболее эффективным оказалось использование рибозимов для ингибирования экспрессии гена, кодирующего VEGF-рецептор. Для воздействия на его мРНК был использован ряд синтетических рибозимов, содержащих тот же набор химических модификаций, что и описанный выше HEPTAZYMETM. Наиболее эффективный из этих рибозимов, получивший название ANGIOZYMETM (компания Ribozyme Pharmaceuticals) (см. рис. 17,б), успешно прошел фазы I и II клинических испытаний.^{5, 81, 179, 188, 209} В ходе исследований было показано, что применение ANGIOZYME в сочетании со стандартными химиотерапевтическими препаратами усиливает их действие, снижая уровень VEGF-рецептора.

Рибозимы могут быть использованы и для лечения генетически обусловленных заболеваний. Показано, что эндогенные рибозимы, направленные на мРНК мутантного гена родопсина, который отвечает за развитие пигментозного ретинита и слепоты, эффективно ингибируют экспрессию этого гена и способны вызывать исчезновение клинических признаков заболевания у животных.^{210–212} Химически синтезированные рибозимы, направленные на мРНК мутантного гена фибриллина-1, который является причиной несовершенного остеогенеза, способны селективно расщеплять только мутантную РНК, отличающуюся от мРНК дикого типа всего одной нуклеотидной заменой.²¹³ На основании этих данных были сконструированы эндогенные рибозимы, способные снижать уровень экспрессии мутантного фибриллина в культуре клеток.^{214, 215}

Было также предложено использовать рибозимы для лечения рестеноза — повторного сужения артерий после их расширения хирургическим путем (ангиопластики, шунтирования), вызванного пролиферацией гладкомышечных клеток сосудов. Для подавления их пролиферации был использован целый ряд как экзогенных синтетических модифицированных рибозимов, содержащих дезоксирибонуклеотиды и тиофосфатные связи, так и эндогенно введенных рибозимов (см. обзор¹⁸⁸). Мишенями для рибозимов были мРНК белков, ответственных за регуляцию клеточного цикла и за подвижность клеток. Так, «химерные» экзогенно введенные рибозимы, направленные на мРНК фактора роста

PDGF-А и эндогенно экспрессируемые рибозимы, направленные на мРНК фактора роста TGF- β , подавляли рост гладкомышечных клеток сосудов у крыс. Удачным было также использование рибозимов, направленных на мРНК транскрипционного фактора E2F1 и циклина Е, — их совместное действие приводило к полному подавлению пролиферации в культуре гладкомышечных клеток.^{188, 216} Для воздействия на хемотаксис гладкомышечных клеток использовали экзогенно введенные «химерные» рибозимы, направленные на мРНК 12-липоксигеназы;²¹⁷ оказалось, что они значительно подавляют рестеноз артерий у крыс.

Таким образом, в настоящее время убедительно показано, что рибозимы «головка молотка» способны не только расщеплять протяженные структурированные мРНК *in vitro*, но и ингибировать экспрессию различных генов в культурах клеток, а в отдельных случаях — даже на уровне организма в целом. При этом необходимо учитывать, что степень ингибирования зависит от конкретной мРНК, клеточной линии, вида модификаций, введенных в рибозим, носителя, выбранного для доставки рибозима, концентрации рибозима и времени жизни мРНК-мишени и соответствующего белка. Все эти факторы осложняют сравнение результатов, полученных различными группами исследователей даже для одного и того же гена.

V. Заключение

На данный момент рибозим «головка молотка» является наиболее хорошо изученным из всех известных рибозимов. Для него определены пространственная структура и механизм расщепления фосфодиэфирных связей в РНК. Благодаря своей способности эффективно и сайт-специфично расщеплять РНК рибозимы «головка молотка», полученные как химическим, так и ферментативным способом, могут быть использованы для ингибирования экспрессии генов на уровне мРНК. Можно выделить ряд уникальных преимуществ рибозимов «головка молотка» по сравнению с другими агентами (антисмысловыми олигонуклеотидами, siRNA):

- расщепление РНК без участия каких-либо дополнительных ферментов;
- исключительно высокая специфичность — для расщепления РНК необходима гибридизация обоих фланкирующих участков рибозима с мишенью и наличие триплета 5'-NUH-3';
- возможность регуляции каталитической активности в зависимости от локального окружения рибозима;
- отсутствие в клетках млекопитающих интерфероновой ответа после введения рибозимов.

Разработаны способы повышения устойчивости рибозимов к действию клеточных нуклеаз, методы экзогенной доставки рибозимов в клетки и конструирования векторов для эндогенной экспрессии рибозимов. Предложены подходы к регуляции каталитической активности рибозимов и увеличению эффективности расщепления природных структурированных РНК. Рибозимы «головка молотка» успешно применяются для ингибирования экспрессии широкого спектра генов в культурах клеток. В ряде случаев отобранные в результате клеточных экспериментов и экспериментов на животных рибозимы прошли фазы I и II клинических испытаний в качестве терапевтических препаратов для лечения злокачественных опухолей и вирусных инфекций.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (ГК

№ 02.522.12.2005) и Совета по грантам Президента РФ для поддержки молодых российских ученых (проект № МК642.2008.4).

Литература

1. R.Bhindi, R.G.Fahmy, H.C.Lowe, C.N.Chesterman, C.R.Dass, M.J.Cairns, E.G.Saravolac, L.Sun, L.M.Khachigian. *Am. J. Pathol.*, **171**, 1079 (2007)
2. I.Drude, V.Dombos, S.Vauleon, S.Müller. *Mini Rev. Med. Chem.*, **7**, 912 (2007)
3. F.Eckstein. *Exp. Opin. Biol. Ther.*, **7**, 1021 (2007)
4. A.Peracchi. *Rev. Med. Virol.*, **14**, 47 (2004)
5. S.Schubert, J.Kurreck. *Curr. Drug Targets*, **5**, 667 (2004)
6. K.Kruger, P.J.Grabowski, A.J.Zaug, J.Sands, D.E.Gottschling, T.R.Cech. *Cell*, **31**, 147 (1982)
7. C.Guerrier-Takada, K.Gardiner, T.Marsh, N.Pace, S.Altman. *Cell*, **35**, 849 (1983)
8. J.A.Doudna, T.R.Cech. *Nature (London)*, **418**, 222 (2002)
9. M.J.Fedor. *Annu. Rev. Biophys.*, **38**, 271 (2009)
10. A.C.Forster, R.H.Symons. *Cell*, **49**, 211 (1987)
11. M.Martick, L.H.Horan, H.F.Noller, W.G.Scott. *Nature (London)*, **454**, 899 (2008)
12. J.Conaty, P.Hendry, T.J.Lockett. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2400 (1999)
13. K. Salehi-Ashtiani, J.W.Szostak. *Nature (London)*, **414**, 82 (2001)
14. O.C.Uhlenbeck. *Nature (London)*, **328**, 596 (1987)
15. J.Haseloff, W.L.Gerlach. *Nature (London)*, **334**, 585 (1988)
16. K.J.Hertel, A.Pardi, O.C.Uhlenbeck, M.Koizumi, E.Ohtsuka, S.Uesugi, R.Cedergren, F.Eckstein, W.L.Gerlach, R.Hodgson. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3252 (1992)
17. M.Martick, T.S.Lee, D.M.York, W.G.Scott. *Chem. Biol.*, **15**, 332 (2008)
18. M.De la Pena, S.Gago, R.Flores. *EMBO J.*, **22**, 5561 (2003)
19. J.C.Penedo, T.J.Wilson, S.D.Jayasena, A.Khvorova, D.M.J.Lilley. *RNA*, **10**, 880 (2004)
20. M.D.Canny, F.M.Jucker, E.Kellogg, A.Khvorova, S.D.Jayasena, A.Pardi. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10848 (2004)
21. J.Nelson, I.Shepotinovskaya, O.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **44**, 14577 (2005)
22. M.S.Weinberg, J.J.Rossi. *FEBS Lett.*, **579**, 1619 (2005)
23. V.Saksmerprome, M.Roychowdhury-Saha, S.Jayasena, A.Khvorova, D.H.Burke. *RNA*, **10**, 1916 (2004)
24. A.Fedoruk-Wyszomirska, M.Szymanski, E.Wyszko, M.Z.Barciszewska, J.Barciszewski. *J. Biochem.*, **145**, 451 (2009)
25. D.E.Ruffner, G.D.Stormo, O.C.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **29**, 10695 (1990)
26. R.Perriman, A.Delves, W.L.Gerlach. *Gene*, **113**, 157 (1992)
27. T.Shimayama, S.Nishikawa, K.Taira. *Biochemistry*, **34**, 3649 (1995)
28. M.Zoumadakis, M.Tabler. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1192 (1995)
29. J.P.Simorre, P.Legault, N.Baidya, O.C.Uhlenbeck, L.Maloney, F.Wincott, N.Usman, L.Beigelman, A.Pardi. *Biochemistry*, **37**, 4034 (1998)
30. A.R.Kore, N.K.Vaish, U.Kutzke, F.Eckstein. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4116 (1998)
31. J.Ludwig, M.Blaschke, B.S.Sproat. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2279 (1998)
32. N.K.Tanner. *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 257 (1999)
33. W.G.Scott. *Quart. Rev. Biophys.*, **32**, 241 (1999)
34. C.Hammann, D.M.Lilley. *ChemBioChem*, **3**, 690 (2002)
35. G.S.Bassi, N.E.Mollegaard, A.I.Murchie, E.von Kitzing, D.M.Lilley. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 45 (1995)
36. C.Hammann, A.Cooper, D.M.Lilley. *Biochemistry*, **40**, 1423 (2001)
37. Y.Takagi, M.Warashina, W.J.Stec, K.Yoshinari, K.Taira. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1815 (2001)
38. J.A.Nelson, O.C.Uhlenbeck. *Mol. Cell*, **23**, 447 (2006)

39. A.C.Rios, Y.Tor. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 660 (2009)
40. M.Martick, W.G.Scott. *Cell*, **126**, 309 (2006)
41. J.A.Nelson, O.C.Uhlenbeck. *RNA*, **14**, 605 (2008)
42. J.A.Nelson, O.C.Uhlenbeck. *RNA*, **14**, 43 (2008)
43. J.M.Thomas, D.M.Perrin. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 15467 (2008)
44. J.M.Thomas, D.M.Perrin. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 1135 (2009)
45. T.K.Stage-Zimmermann, O.C.Uhlenbeck. *RNA*, **4**, 875 (1998)
46. F.Burlina, A.Favre, J.L.Fourrey. *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 1999 (1997)
47. M.J.McCall, P.Hendry, A.Mir, J.Conaty, G.Brown, T.Lockett. *Mol. Biotechnol.*, **14** (2000)
48. С.М.Женюдарова. *Мол. биол.*, **28**, 506 (1994)
49. С.М.Женюдарова. *Мол. биол.*, **32**, 401 (1998)
50. P.Hendry, M.J.McCall, F.S.Santiago, P.A.Jennings. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3922 (1995)
51. M.Sioud, A.Opstad, P.Hendry, T.J.Lockett, P.A.Jennings, M.J.McCall. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 397 (1997)
52. D.M.Long, O.C.Uhlenbeck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6977 (1994)
53. T.Persson, R.K.Hartmann, F.Eckstein. *ChemBioChem*, **3**, 1066 (2002)
54. S.V.Amontov, S.Nishikawa, K.Taira. *FEBS Lett.*, **386**, 99 (1996)
55. S.V.Amontov, K.Taira. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1624 (1996)
56. T.Kuwabara, S.V.Amontov, M.Warashina, J.Ohkawa, K.Taira. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2302 (1996)
57. T.Kuwabara, M.Warashina, M.Orita, S.Koseki, J.Ohkawa, K.Taira. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 961 (1998)
58. T.Kuwabara, M.Warashina, A.Nakayama, J.Ohkawa, K.Taira. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1886 (1999)
59. A.Nakayama, T.Kuwabara, K.Taira. *FEBS Lett.*, **448**, 67 (1999)
60. T.Kuwabara, M.Warashina, T.Tanabe, K.Tani, S.Asano, K.Taira. *Mol. Cell*, **2**, 617 (1998)
61. M.Hamada, T.Kuwabara, M.Warashina, A.Nakayama, K.Taira. *FEBS Lett.*, **461**, 77 (1999)
62. T.Tanabe, I.Takata, T.Kuwabara, M.Warashina, H.Kawasaki, K.Tani, S.Ohta, S.Asano, K.Taira. *Biomacromolecules*, **1**, 108 (2000)
63. T.Kuwabara, M.Warashina, K.Taira. *Trends Biotechnol.*, **18**, 462 (2000)
64. T.Kuwabara, M.Hamada, M.Warashina, K.Taira. *Biomacromolecules*, **2**, 788 (2001)
65. T.Kuwabara, T.Tanabe, M.Warashina, K.X.Xiong, K.Tani, K.Taira, S.Asano. *Biomacromolecules*, **2**, 1120 (2001)
66. M.Koizumi, I.Shigenori, E.Ohtsuka. *FEBS Lett.*, **239**, 285 (1988)
67. M.Koizumi, Y.Hayase, I.Shigenori, H.Kamiya, H.Inoue, E.Ohtsuka. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 7059 (1989)
68. M.Koizumi, E.Ohtsuka. In *Antisense RNA and DNA*. Wiley, New York, 1992. P. 373
69. M.Koizumi, T.Ohta, Y.Komatsu, E.Ohtsuka. *Nucleosides Nucleotides*, **15**, 505 (1996)
70. M.Kuznetsova, A.Fokina, M.Lukin, M.Repkova, A.Veniaminova, V.Vlassov. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **22**, 1521 (2003)
71. M.Kuznetsova, D.Novopashina, M.Repkova, A.Veniaminova, V.Vlassov. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **23**, 1037 (2004)
72. M.Vorobjeva, E.Gusseva, M.Repkova, N.Kovalev, M.Zenkova, A.Veniaminova, V.Vlassov. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 1105 (2005)
73. M.Vorobjeva, M.Zenkova, A.Veniaminova, V.Vlassov. *Oligonucleotides*, **16**, 239 (2006)
74. М.А.Воробьева, Н.А.Ковалев, М.А.Зенкова, А.Г.Веньяминова, В.В.Власов. *Информационный вестник ВОГиС*, **10**, 321 (2006)
75. М.А.Воробьева, М.А.Зенкова, А.Г.Веньяминова, В.В.Власов. *Вестн. НГУ. Сер. Биология, клиническая медицина*, **5**, 111 (2007)
76. M.A.Vorobjeva, A.S.Privalova, A.G.Veniaminova, V.V.Vlassov. In *Biosphere Origin and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin, 2008. P. 143
77. O.Heidenreich, F.Benseler, A.Fahrenholz, F.Eckstein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2131 (1994)
78. L.Beigelman, A.Karpeisky, J.Matulic-Adamic, P.Haeberli, D.Sweedler, N.Usman. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4434 (1995)
79. L.Beigelman, J.A.McSwiggen, K.G.Draper, C.Gonzalez, K.Jensen, A.M.Karpeisky, A.S.Modak, J.Matulic-Adamic, A.B.DiRenzo, P.Haeberli. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25702 (1995)
80. A.B.DiRenzo, S.Grimm, K.Levy, P.Haeberli, L.Maloney, N.Usman, F.Wincott. *Nucleosides Nucleotides*, **15**, 1687 (1996)
81. N.Usman, L.Blatt. *J. Clin. Invest.*, **106**, 1197 (2000)
82. T.C.Jarvis, F.E.Wincott, L.J.Alby, J.A.McSwiggen, L.Beigelman, J.Gustofson, A.B.DiRenzo, K.Levy, M.Arthur, J.Matulic-Adamic, A.Karpeisky, C.Gonzalez, T.M.Woolf, N.Usman, D.T.Stinchcomb. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29107 (1996)
83. J.W.Engels, M.Scherr, A.Ganser, M.Grez, V.Wittmann. *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 1685 (1998)
84. R.Pontiggia, O.Pontiggia, M.Simian, J.M.Montserrat, J.W.Engels, A.M.Iribarren. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 2806 (2010)
85. J.K.Christiansen, S.Lobedanz, K.Arar, J.Wengel, B.Vester. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 6135 (2007)
86. J.Goodchild. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4607 (1992)
87. S.Nesbitt, J.Goodchild. *Antisense Res. Dev.*, **4**, 243 (1994)
88. T.A.Perkins, D.E.Wolf, J.Goodchild. *Biochemistry*, **35**, 16370 (1996)
89. E.Hovig, G.Maelandsmo, T.Mellingsaeter, O.Fodstad, S.S.Mielewczyk, J.Wolfe, J.Goodchild. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **11**, 67 (2001)
90. E.Jankowsky, B.Schwenzer. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 423 (1996)
91. E.Jankowsky, B.Schwenzer. *Biochemistry*, **35**, 15313 (1996)
92. E.Jankowsky, G.Strunk, B.Schwenzer. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2690 (1997)
93. R.B.Denman. *FEBS Lett.*, **382**, 116 (1996)
94. E.Jankowsky, B.Schwenzer. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 129 (1998)
95. J.Chen, W.Chu, H.Wu, Y.Hsu, J.Wu. *Mar. Biotechnol. (NY)*, **2**, 364 (2000)
96. A.C.Banerjee, N.Gupta, A.S.Bano, Y.Sharma, V.Sood. *Open Biotechnol. J.*, **2**, 1 (2008)
97. G.A.Soukup, R.R.Breaker. *Trends Biotechnol.*, **17**, 137 (1999)
98. G.A.Soukup, R.R.Breaker. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 318 (2000)
99. J.Tang, R.R.Breaker. *Chem. Biol.*, **4**, 453 (1998)
100. M.Araki, Y.Okuno, Y.Hara, Y.Sugira. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3379 (1998)
101. J.Tang, R.R.Breaker. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4214 (1998)
102. M.Koizumi, G.A.Soukup, J.N.Q.Kerr, R.R.Breaker. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1062 (1999)
103. G.A.Soukup, R.R.Breaker. *Structure*, **7**, 783 (1999)
104. G.A.Soukup, R.R.Breaker. *Biochemistry*, **96**, 3584 (1999)
105. A.M.Jose, G.A.Soukup, R.R.Breaker. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1631 (2001)
106. M.Araki, M.Hashima, Y.Okuno, Y.Sugira. *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 1155 (2001)
107. A.Ferguson, R.M.Boomer, M.Kurz, S.C.Keene, J.L.Diener, A.D.Keefe, C.Wilson, S.T.Cload. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1756 (2004)
108. H.-W.Lee, S.G.Robinson, S.Bandyopadhyay, R.H.Mitchell, D.Sen. *J. Mol. Biol.*, **371**, 1163 (2007)
109. Y.Komatsu, S.Yamashita, N.Kazama, K.Nobuoka, E.Ohtsuka. *J. Mol. Biol.*, **299**, 1231 (2000)
110. Y.Komatsu. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 457 (2004)
111. Y.Komatsu, E.Ohtsuka. In *Ribozymes and siRNA Protocols*. Vol. 252. Humana Press, Totowa, NJ, 2004. P. 165
112. D.H.Burke, N.D.Ozerova, M.Nilsen-Hamilton. *Biochemistry*, **41**, 6588 (2002)
113. V.Saksmerprome, D.H.Burke. *Biochemistry*, **42**, 13879 (2003)

114. D.Y.Wang, D.Sen. *J. Mol. Biol.*, **310**, 723 (2001)
115. D.Y.Wang, B.H.Lai, A.R.Feldman, D.Sen. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1735 (2002)
116. D.Y.Wang, B.H.Y.Lai, D.Sen. *J. Mol. Biol.*, **318**, 33 (2002)
117. K.Birikh, Y.Berlin, H.Soreq, F.Eckstein. *RNA*, **3**, 429 (1997)
118. A.Mir, T.J.Lockett, P.Hendry. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1906 (2001)
119. J.J.Zhao, G.Lemke. *Mol. Cell. Neurosci.*, **11**, 92 (1998)
120. M.Amarzguioui, G.Brede, E.Babaie, M.Grotli, B.Sproat, H.Prydz. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4113 (2000)
121. A.Lieber, M.Strauss. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 540 (1995)
122. B.Bramlage, E.Luzi, F.Eckstein. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4059 (2000)
123. W.-H.Pan, G.A.Clawson. In *Ribozymes and siRNA Protocols*. Vol. 252. Humana Press, Totowa, NJ, 2004. P. 125
124. M.Warashina, T.Kuwabara, Y.Kato, M.Sano, K.Taira. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5572 (2001)
125. B.Nawrot, S.Antoszyk, M.Maslewska, T.Kuwabara, M.Warashina, K.Taira, W.J.Stec. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3962 (2003)
126. S.Koseki, T.Tanabe, K.Tani, S.Asano, T.Shioda, Y.Nagai, T.Shimada, J.Ohkawa, K.Taira. *J. Virol.*, **73**, 1868 (1999)
127. M.Shiota, M.Sano, M.Miyagishi, K.Taira. *J. Biochem.*, **136**, 133 (2004)
128. S.Koseki, J.Ohkawa, R.Yamamoto, Y.Takebe, K.Taira. *J. Control Release*, **53**, 159 (1998)
129. R.Onuki, A.Nagasaki, H.Kawasaki, T.Baba, T.Q.P.Uyeda, K.Taira. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14716 (2002)
130. E.Suyama, H.Kawasaki, M.Nakajima, K.Taira. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5616 (2003)
131. R.Onuki, Y.Bando, E.Suyama, T.Katayama, H.Kawasaki, T.Baba, M.Tohyama, K.Taira. *EMBO J.*, **23**, 959 (2004)
132. E.Suyama, R.Wadhwa, K.Kaur, M.Miyagishi, S.C.Kaul, H.Kawasaki, K.Taira. *J. Biol. Chem.*, **279**, 38083 (2004)
133. R.Wadhwa, T.Yaguchi, K.Kaur, E.Suyama, H.Kawasaki, K.Taira, S.C.Kaul. *J. Biol. Chem.*, **279**, 51622 (2004)
134. M.Sano, Y.Kato, K.Taira. *Mol. Biosyst.*, **1**, 27 (2005)
135. M.Tabler, M.Homann, S.Tzortzakaki, G.Szczakiel. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3958 (1994)
136. R.Hormes, M.Homann, I.Oelze, P.Marschall, M.Tabler, F.Eckstein, G.Szczakiel. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 769 (1997)
137. M.Tabler, G.Szczakiel. In *Ribozyme Protocols*. Vol. 74. Humana Press, Totowa, NJ, 1997. P. 141
138. C.Hammann, M.Tabler. *Methods*, **18**, 273 (1999)
139. Z.Hao, J.Luo, J.Cheng, Q.Wang, G.Yang. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 104 (2003)
140. M.Szyrach, F.E.Munchberg, H.Riehle, A.Nordheim, J.Krauter, S.Nagel, G.Heil, O.Heidenreich. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3550 (2001)
141. C.Hammann, E.Martinez, J.Moosbauer, R.Hormes, M.Tabler. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **9**, 25 (1999)
142. P.Hendry, M.McCall. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2679 (1996)
143. М.А.Воробьева, А.А.Фокина, А.С.Привалова, А.Н.Зенков, А.Г.Веньямина. В кн. *Материалы V Конференции молодых ученых СО РАН, посвященной М.А.Лаврентьеву*. Новосибирск, 2007. С. 26
144. М.А.Воробьева, А.С.Привалова, М.А.Зенкова, А.Г.Веньямина, В.В.Власов. В кн. *Сборник трудов международной конференции «Физико-химическая биология», посвященной 80-летию академика Д.Г. Кнорре*. Арта, Новосибирск, 2006. С. 98
145. M.D.Hughes, M.Hussain, Q.Nawaz, P.Sayyed, S.Akhtar. *Drug Discov. Today*, **6**, 303 (2001)
146. E.Bertrand, D.Castanotto, C.Zhou, C.Carbonnelle, N.S.Lee, P.Good, S.Chatterjee, T.Granger, R.Pictet, D.Kohn, D.Engelke, J.J.Rossi. *RNA*, **3**, 75 (1997)
147. N.S.Lee, E.Bertrand, J.Rossi. *RNA*, **5**, 1200 (1999)
148. W.-H.Hu, V.K.Pathak. *Pharm. Rev.*, **52**, 493 (2000)
149. A.Michienzi, L.Cagnon, I.Bahner, J.J.Rossi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8955 (2000)
150. O.Seksek, J.Bolard. In *Ribozymes and siRNA Protocols*. Vol. 252. Humana Press, Totowa, NJ, 2004. P. 545
151. A.Khan, M.Benboubetra, P.Sayyed, K.W.Ng, S.Fox, G.Beck, I.Benter, S.Akhtar. *J. Drug Target.*, **12**, 393 (2004)
152. A.J.Hudson, N.Normand, J.Ackroyd, S.Akhtar. *Int. J. Pharm.*, **182**, 49 (1999)
153. C.Flory, P.Pavco, T.Jarvis, M.Lesch, F.Wincott, L.Beigelman, S.Hun, D.Schrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 754 (1996)
154. T.J.Parry, C.Cushman, A.M.Gallegos, A.B.Agrawal, M.Richardson, L.E.Andrews, L.Maloney, V.R.Mokler, F.E.Wincott, P.A.Pavco. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2569 (1999)
155. J.J.Rossi. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **44**, 71 (2000)
156. J.Haasnoot, B.Berkhout. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **189**, 243 (2009)
157. C.J.Chen, A.C.Banerjee, G.G.Harmison, K.Haglund, M.Schubert. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4581 (1992)
158. A.Ramezani, X.Z.Ma, R.Nazari, S.Joshi. *Front. Biosci.*, **7**, 29 (2002)
159. R.Nazari, X.Z.Ma, S.Joshi. *J. Gen. Virol.*, **89**, 2252 (2008)
160. J.Ohkawa, N.Yuyama, Y.Takebe, S.Nishikawa, K.Taira. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11302 (1993)
161. J.Ohkawa, Y.Takebe, K.Taira. In *Therapeutic Applications of Ribozymes*. Vol. 11. Humana Press, Totowa, NJ, 1998. P. 83
162. F.Wong-Staal, E.M.Poeschla, D.J.Looney. *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2407 (1998)
163. F.K.Ngok, R.T.Mitsuyasu, J.L.Macpherson, M.P.Boyd, G.P.Symonds, R.G.Amado. In *Ribozymes and siRNA Protocols*. Vol. 252. Humana Press, Totowa, NJ, 2004. P. 581
164. J.L.Macpherson, M.P.Boyd, A.J.Arndt, A.V.Todd, G.C.Fanning, J.A.Ely, F.Elliott, A.Knop, M.Raponi, J.Murray, W.Gerlach, L.-Q.Sun, R.Penny, G.P.Symonds, A.Carr, D.A.Cooper. *J. Gene Med.*, **7**, 552 (2005)
165. R.T.Mitsuyasu, 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. *Nat. Med.*, **15** (2009)
166. L.Q.Sun, L.Wang, W.L.Gerlach, G.Symonds. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2939 (1995)
167. L.Citti, G.Rainaldi. *Curr. Gene Ther.*, **5**, 11 (2005)
168. A.Michienzi, D.Castanotto, N.Lee, S.Li, J.A.Zaia, J.J.Rossi. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, **3**, 223 (2003)
169. M.Li, H.Li, J.J.Rossi. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1082**, 172 (2006)
170. J.Anderson, M.-J.Li, B.Palmer, L.Remling, S.Li, P.Yam, J.-K.Yee, J.Rossi, J.Zaia, R.Akkina. *Mol. Ther.*, **15** (2007)
171. V.Sood, H.Unwalla, N.Gupta, S.Chakraborti, A.C.Banerjee. *AIDS*, **21**, 31 (2007)
172. A.Lieber, C.Y.He, S.J.Polyak, D.R.Gretch, D.Barr, M.A.Kay. *J. Virol.*, **70**, 8782 (1996)
173. D.G.Macejak, K.L.Jensen, S.F.Jamison, K.Domenico, E.C.Roberts, N.Chaudhary, I.von Carlowitz, L.Bellon, M.J.Tong, A.Conrad, P.A.Pavco. *Hepatology*, **31**, 769 (2000)
174. T.Hugle, A.Cerny. *Rev. Med. Virol.*, **137**, 361 (2003)
175. C.Romero-Lopez, R.Diaz-Gonzalez, A.Barroso-del Jesus, A.Berzal-Herranz. *J. Gen. Virol.*, **90**, 1659 (2009)
176. J.Beck, M.Nassal. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4954 (1995)
177. T.M.Tan, L.Zhou, S.Houssais, B.L.Seet, S.Jaenicke, F.Peter, S.G.Lim. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **12**, 257 (2002)
178. D.V.Morrissey, D.A.Johnson, S.L.Overly, J.A.McSwiggen, L.Beigelman, V.R.Mokler, L.Maloney, C.Vargeese, K.Bowman, J.T.O'Brien, C.S.Shaffer, A.Conrad, P.Schmid, J.D.Morrey, D.G.Macejak, P.A.Pavco. *J. Viral. Hepat.*, **9**, 411 (2002)

179. P.A.Pavco, K.S.Bouhana, A.M.Gallegos, A.Agrawal, K.S.Blanchard, S.L.Grimm, K.L.Jensen, L.E.Andrews, F.E.Wincott, P.A.Pitot, R.J.Tressler, C.Cushman, M.A.Reynolds, T.J.Parry. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2094 (2000)
180. P.Karayiannis. *J. Antimicrob. Chemother.*, **51**, 761 (2003)
181. N.Gupta, A.S.Bano, Y.Sharma, A.C.Banerjea. *Oligonucleotides*, **18**, 225 (2008)
182. A.Fukushima, N.Fukuda, Y.Lai, T.Ueno, M.Moriyama, F.Taguchi, A.Iguchi, K.Shimizu, K.Kuroda. *Intervirology*, **52**, 92 (2009)
183. P.Nawtaisong, J.Keith, T.Fraser, V.Balaraman, A.Kolokoltsov, R.A.Davey, S.Higgs, A.Mohammed, Y.Rongsriyam, N.Komalamisra, M.J.Fraser Jr. *Virol. J.*, **6**, 73 (2009)
184. J.Liu, A.S.Lewin, S.S.Tuli, S.C.Ghivizzani, G.S.Schultz, D.C.Bloom. *J. Virol.*, **82**, 7467 (2008)
185. M.Scherr, M.Grez, A.Ganser, J.W.Engels. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14304 (1997)
186. C.-H.Wang, L.-J.Tsai, Y.-P.Tsao, J.-T.Hsieh, W.-W.Chien, C.-L.Liao, H.-W.Wang, H.-S.Liu, S.-L.Chen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 805 (2002)
187. T.Tokunaga, T.Tsuchida, H.Kijima, K.Okamoto, Y.Oshika, N.Sawa, Y.Ohnishi, H.Yamazaki, S.Miura, Y.Ueyama, M.Nakamura. *Br. J. Cancer*, **83**, 833 (2000)
188. G.Grassi, P.Dawson, G.Guarneri, R.Kandolf, M.Grassi. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **5**, 369 (2004)
189. S.Z.Torabian, D.de Semir, M.Nosrati, S.Bagheri, A.A.Dar, S.Fong, Y.Liu, S.Federman, J.Simko, C.Haqq, R.J.Debs, M.Kashani-Sabet. *Am. J. Pathol.*, **174**, 1009 (2009)
190. M.Sioud. *Int. J. Mol. Med.*, **3**, 381 (1999)
191. S.A.Gibson, C.Pellenz, R.E.Hutchison, F.R.Davey, E.J.Shillitoe. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 213 (2000)
192. M.Pennati, G.Colella, M.Folini, L.Citti, M.Daidone, N.Zaffaroni. *J. Clin. Invest.*, **109**, 285 (2002)
193. H.Liu, S.Guo, R.Roll, J.Li, Z.Diao, N.Shao, M.R.Riley, A.M.Cole, J.P.Robinson, N.M.Snead, G.Shen, P.Guo. *Cancer Biol. Ther.*, **6**, 697 (2007)
194. Q.Fei, H.Zhang, L.Fu, X.Dai, B.Gao, M.Ni, C.Ge, J.Li, X.Ding, Y.Ke, X.Yao, J.Zhu. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **40**, 466 (2008)
195. M.S.Wan, P.L.Fell, S.Akhtar. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **8**, 309 (1998)
196. M.Nosrati, S.Li, S.Bagheri, D.Ginzinger, E.H.Blackburn, R.J.Debs, M.Kashani-Sabet. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 4983 (2004)
197. Z.M.Hao, J.Y.Luo, J.Cheng, L.Li, D.He, Q.Y.Wang, G.X.Yang. *Cancer Biol. Ther.*, **4**, 1098 (2005)
198. H.Kobayashi, T.Dorai, F.Holland, T.Ohnuma. *Cancer Res.*, **54**, 1271 (1994)
199. J.Bertram, K.Palfner, M.Killian, W.Brysch, K.H.Schlingensiepen, W.Hiddemann, M.Kneba. *Anticancer Drugs*, **6**, 124 (1995)
200. Y.Masuda, H.Kobayashi, J.F.Holland, T.Ohnuma. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, 9 (1998)
201. H.Matsushita, K.Masahiro, H.Kobayashi, H.Ueno, A.Muto, N.Takayama, K.Awaya, K.Kinjo, T.Hattori, Y.Ikeda. *Blood*, **91**, 2452 (1998)
202. P.S.Holm, K.J.Scanlon, M.Dietel. *Br. J. Cancer*, **70**, 239 (1994)
203. Zhen.Gao, Zhip.Gao, J.Z.Fields, B.M.Boman. *Int. J. Cancer*, **82**, 346 (1999)
204. H.Kobayashi, Y.Takemura, F.-S.Wang, T.Oka, T.Ohnuma. *Int. J. Cancer*, **81**, 944 (1999)
205. H.Wang, X.-P.Chen, F.-Z.Qiu. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 1444 (2003)
206. P.Gao, G.Zhou, Q.Zhang, H.Li, K.Mu, Y.Yuan, J.Zhang, B.Wang. *Chin. J. Physiol.*, **49**, 96 (2006)
207. P.Gao, G.-Y.Zhou, L.-L.Guo, Q.-h.Zhang, J.-H.Zhen, A.-J.Fang, X.-Y.Lin. *Cancer Lett.*, **256**, 81 (2007)
208. P.Kowalski, P.Surowiak, H.Lage. *Mol. Ther.*, **11**, 508 (2005)
209. D.E.Weng, P.A.Masci, S.F.Radka, T.E.Jackson, P.A.Weiss, R.Ganapathi, P.J.Elson, W.B.Capra, V.P.Parker, J.A.Lockridge, J.W.Cowens, N.Usman, E.C.Borden. *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 948 (2005)
210. K.A.Drenser, A.M.Timmers, W.W.Hauswirth, A.S.Lewin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 681 (1998)
211. E.Chaum, M.P.Hatton. *Surv. Ophthalmol.*, **47**, 449 (2002)
212. M.S.Gorbatyuk, J.J.Pang, J.Thomas Jr., W.W.Hauswirth, A.S.Lewin. *Mol. Vis.*, **11**, 648 (2005)
213. G.Grassi, A.Forlino, J.C.Marini. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3451 (1997)
214. P.A.Dawson, J.C.Marini. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4013 (2000)
215. Y.Smicun, M.Kilpatrick, J.Florer, I.Toudjarska, G.Wu, R.Wenstrup, P.Tsipouras. *Gene Ther.*, **10**, 2005 (2003)
216. G.Grassi, A.Schneider, S.Engel, G.Racchi, R.Kandolf, A.Kuhn. *J. Gene Med.*, **7**, 1223 (2005)
217. J.-L.Gu, H.Pei, L.Thomas, J.L.Nadler, J.J.Rossi, L.Lanting, R.Natarajan. *Circulation*, **103**, 1446 (2001)

ARTIFICIAL HAMMERHEAD RIBOZYMES: DESIGN AND APPLICATIONS

M.A.Vorobjeva, A.S.Davydova, A.G.Veniaminova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

8, Prosp. Akad. Lavrentieva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)363-5153

The properties of ribozymes with the hammerhead structure are presented. Various ribozyme constructions based on the hammerhead model for targeted cleavage of RNA are considered. The approaches to the increase in the stability of artificial ribozymes in biological media and to the control of catalytic activity of the hammerhead ribozymes using effector molecules are outlined. The problem of ribozyme action on extended structured natural RNA is discussed. The application of artificial hammerhead ribozymes as gene expression inhibitors at the matrix RNA level are considered.

Bibliography — 217 references.

Received 2nd February 2010