

СИНТЕЗ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК, МОДИФИЦИРОВАННОЙ R6G – ЛИГАНДОМ ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКИ В МИТОХОНДРИИ

В настоящее время РНК олигонуклеотиды находят широкое применение в терапии: миРНК, аптамеры, антисмысловые олигонуклеотиды, антагомиры, РНК-вакцины, направляющие РНК и другие [1, 2]. Среди этого множества следует выделить систему CRISPR/CAS, направленную на редактирование двухцепочечной ДНК, где в качестве одного из компонентов используется РНК олигонуклеотид (направляющая РНК) [3, 4]. Известно, что накопление мутаций в митохондриальных ДНК (мтДНК) связано с целым рядом нейромышечных и когнитивных заболеваний [5]. Использование технологии CRISPR/Cas для редактирования мтДНК имеет высокий потенциал в терапии таких заболеваний. Для осуществления этого подхода необходимо выполнить доставку компонентов системы CRISPR/CAS - нуклеазы семейства CAS и направляющей РНК, в митохондрии. Однако, в этой задаче есть определённые трудности, связанные с преодолением клеточной и митохондриальной мембран [6–8].

Целью данной работы был синтез направляющей РНК, модифицированной лигандом целевой доставки, обеспечивающим проникновение сквозь митохондриальную мембрану и, таким образом, осуществляющим импорт одного из компонентов системы CRISPR/CAS в митохондрии.

В результате работы был оптимизирован протокол синтеза направляющих РНК-олигонуклеотидов на приборе ASM-2000. Также была отработана методика очистки длинных РНК (от 40 оснований и больше). Используя отработанные протоколы были получены направляющие РНК-олигонуклеотиды как в нативной форме (без модификаций), так и предназначенные для дальнейшей постсинтетической модификации (модифицированные алкиновой функцией). Полученные алкин-модифицированные олигонуклеотиды были вовлечены в реакцию медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения с красителем родаминового ряда R6G, который имеет сродство к митохондриальной мембране [9, 10]. Полученные конъюгаты были выделены и охарактеризованы методом ВЭЖХ.

Таким образом, были отработаны условия синтеза и очистки направляющих РНК, а также были получены их конъюгаты, предназначенные для обеспечения доставки компонента системы CRISPR/CAS в митохондрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lieberman J. Tapping the RNA world for therapeutics // *Nat. Struct. Mol. Biol.* Springer US, 2018. Vol. 25, № 5. P. 357–364.
2. Yu A.M. et al. RNA therapy: Are we using the right molecules? // *Pharmacol. Ther.* The Authors, 2019. Vol. 196. P. 91–104.
3. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond // *Nat. Commun.* Springer US, 2018. Vol. 9, № 1.
4. You L. Advancements and Obstacles of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Research // *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, 2019. Vol. 13, № June. P. 359–370.
5. Ryzhkova A.I. et al. Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations: A mini-review // *Ther. Clin. Risk Manag.* 2018. Vol. 14. P. 1933–1942.
6. Kawamura E. Targeted mitochondrial delivery of antisense RNA-containing nanoparticles by a MITO-Porter for safe and efficient mitochondrial gene silencing // *Mitochondrion*, 2019. Vol. 49, № 11, 2018. P. 178–188.
7. Orishchenko K.E. Delivery Cas9 into mitochondria // *Genes and Cells*. 2016. Vol. 11, № 2. P. 100–105.
8. Kaczmarek J.C., Kowalski P.S., Anderson D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality // *Genome Med. Genome Medicine*, 2017. Vol. 9, № 1. P. 1–16.
9. Antonenko Y.N. et al. Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 20. P. 17831–17840.
10. Antonenko Y.N. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: Synthesis and in vitro studies // *Biochem.* 2008. Vol. 73, № 12. P. 1273–1287.