

МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ ДНКЗИМНЫЕ НАНОМАШИНЫ: СТРУКТУРА, ПРИМЕНЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2024 г. Д. Д. НЕДОРЕЗОВА¹, М. С. РУБЕЛЬ¹,
А. А. РУБЕЛЬ^{2,*}

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский Государственный Университет,
Санкт-Петербург, Россия

I. Введение. II. ДНК-наномашин и их структура. III. ДНКзимные
сенсоры в диагностике. IV. ДНКзимы в терапии заболеваний.
V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновые кислоты (НК) (ДНК и РНК) – один из основных материалов живой природы, которые присутствуют присутствуют в клетках всех живых организмов, и выполняют важнейшие функции по хранению, передаче и реализации наследственной информации. С точки зрения структуры, НК представляют собой линейные биополимеры, образованные остатками нуклеотидов. При этом как ДНК, так и РНК, могут формировать сложные вторичные структуры. Примерами таких искусственно созданных структур являются ДНК-оригами и DX (от «Double-crossover»)-платформы, которые образуются при взаимодействии специфических последовательностей нуклеотидов в одной молекуле ДНК.

Важным свойством НК со сложной структурой является способность к самосборке, благодаря чему можно создавать сложные нано-

Принятые сокращения: НК – нуклеиновые кислоты; DX – double crossover (двойной кроссоверный); FAM – флуоросцеин амедит; Ф-субстрат – репортерный флуоресцентный зонд; MDMR1 – многофункциональная ДНК-наномашин для анализа РНК; АСО – антисмысловые олигонуклеотиды; Дза, Дзб – фрагменты ДНК-наномашин, составляющие часть ДНКзимного ядра.

*Адрес для корреспонденции: a.rubel@spbu.ru

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 22-24-00664) (Д. Д. Недорезова и М.С. Рубель) и проекта № 95444727 Санкт-Петербургского государственного университета (А.А. Рубель).

структуры, способные распознавать и связываться с определенными молекулами в организме. Также для целого ряда НК (например, для ДНКзимов) показано, что подобно ферментам они могут выполнять в клетках простейшие химические реакции, такие как модификация нуклеиновых кислот, в частности реакции расщепления (гидролиза) и лигирования молекул ДНК и РНК. Описанные свойства позволяют создавать на основе нуклеиновых кислот ДНК-наномашин, способные выполнять простейшие функции расщепления фрагментов ДНК или РНК в клетке или субстрата-репортерной пробы в растворе. Такие ДНК-наномашин могут использоваться для создания новых методов диагностики и лечения различных заболеваний, не нарушающих патентную чистоту.

Данный обзор посвящен сложным наномашинам, созданным на основе ДНК и включающих РНК-расщепляющие ДНКзимы в качестве реакционного центра. В обзоре рассмотрены особенности их структуры, а также возможности их применения в диагностике и терапии заболеваний. Описываются преимущества, недостатки, а также перспективы дальнейшего использования ДНК-наномашин, содержащих РНК-расщепляющие ДНКзимы.

II. ДНК-НАНОМАШИНЫ И ИХ СТРУКТУРА

ДНК-наномашин – это молекулярные комплексы, созданные на основе одноцепочечных нитей ДНК (олигонуклеотидов) и способные выполнять простейшие функции на уровне наномасштаба. В основе работы ДНК-наномашин лежит принцип молекулярной самоорганизации и комплементарного взаимодействия между нуклеотидными последовательностями [1]. В случае, если ДНК-наномашин имеет сложную структуру, которую невозможно собрать за один этап, то осуществляют её последовательную сборку путем добавления компонентов ДНК к уже собранной конструкции [2]. Синтез олигонуклеотидов для получения ДНК-наномашин, как правило, осуществляют с помощью ДНК-синтезаторов, которые позволяют также присоединять к молекулам НК функциональные элементы, такие как гексаэтиленгликоль и пентаэтиленгликоль.

В составе ДНК-наномашин выделяют три структурных элемента: (1) ДНК-каркас, (2) ДНК-переключатели, (3) функциональные группы (Рис. 1).

ДНК-каркас является основой ДНК-наномашин и отвечает за удержание всех функциональных элементов наномашин вместе. В зависимости от функционала наномашин, ДНК-каркасы могут

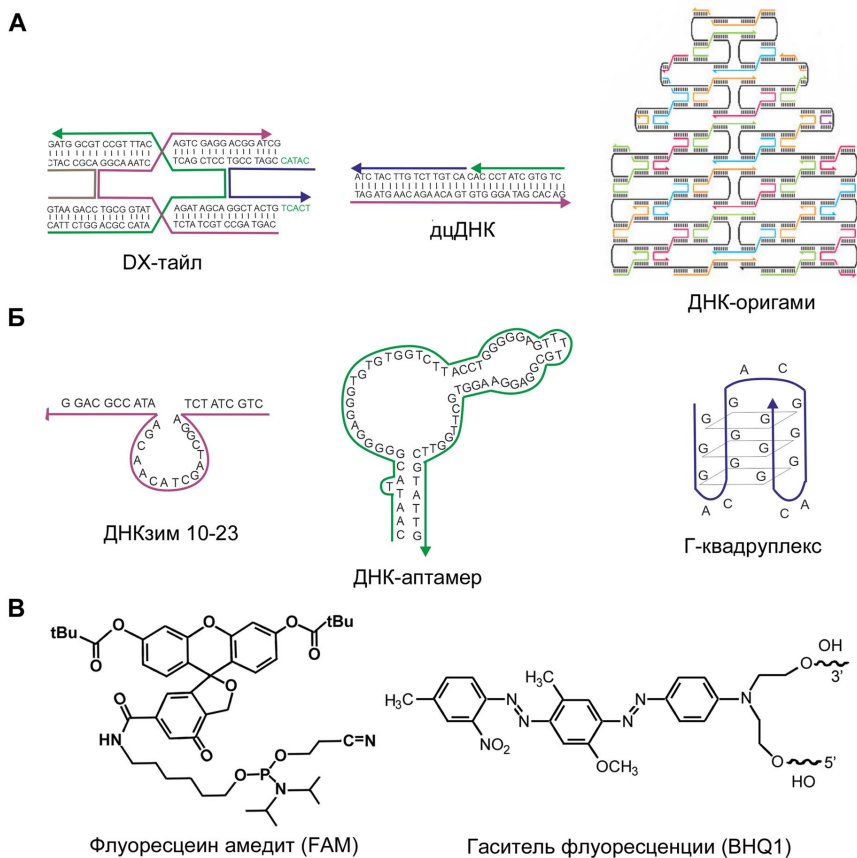


Рис. 1. Компоненты ДНК-наномашин.
 (А) Примеры ДНК-каркасов.
 (Б) Примеры ДНК-переключателей.
 (В) Примеры функциональных групп.

состоять из небольших двуцепочечных ДНК или более сложно организованных структур ДНК, таких как DX (от англ. «Double-crossover»)-платформы, ДНК-оригами, обеспечивающих создание жестких двумерных и трехмерных структур [3]. Для дизайна структуры ДНК-каркасов используют биоинформатические алгоритмы, такие как mFold [4] или NuPack [5], позволяющие относительно точно предсказывать необходимые последовательности олигонуклеотидов для создания интересующей структуры [3].

ДНК-переключатели и функциональные группы – это «рабочие» части ДНК-наномашин, обеспечивающие выполнение заданных функций. В качестве ДНК-переключателей в составе ДНК-наномашин обычно используются ДНКзимы и ДНК аптамеры. Рабочие части ДНК-наномашин способны выполнять такие функции как присоединение, расщепление и связывание белков или нуклеиновых кислот. Также они отвечают за изменение конформации ДНК-наномашин в ответ на стимулы, например, при создании детектируемого сигнала или высвобождении терапевтического агента [6]. В качестве функциональных групп ДНК-наномашин используют флуоресцентные метки для визуализации, антитела для определения и связывания специфических молекул, а также любые химически активные группы, позволяющие ДНК-наномашинам взаимодействовать с другими молекулами или системами [7].

ДНК-наномашин можно проектировать и программировать для выполнения разнообразных функций, таких как детекция различных молекул, в том числе РНК и ДНК; реакция на изменение условий среды, например, рН или температуры; а также для доставки лекарств, детекции биомаркеров или регуляции активности генов [6]. Можно легко модифицировать структуру и функции ДНК-наномашин, подбирая последовательности ДНК, а также варьируя переключатели и функциональные компоненты.

ДНК-НАНОМАШИНЫ НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ

Одним из типов часто используемого ДНК-переключателя в ДНК-наномашинах являются дезоксирибозимы (ДНКзимы или ДНК-ферменты) [8]. ДНКзимы – короткие одноцепочечные молекулы ДНК, обладающие каталитической активностью. В основе выполнения ДНКзимами ферментативных функций лежит способность одноцепочечных молекул ДНК формировать сложные трехмерные структуры, обладающие карманами связывания лигандов, которые являются каталитическими центрами для осуществления широкого круга химических реакций. В этой связи, подобно молекулам РНК и белкам, ДНКзимы способны выполнять широкий спектр ферментативных функций, таких как ковалентная модификация нуклеиновых кислот, в частности фосфорилирование, аденилирование и дегликозилирование ДНК, реакции расщепления (гидролиза) и лигирования молекул ДНК и РНК, а также их окисление и восстановление [9, 10]. Каталитическая активность ДНКзимов определяется наличием особого высококонсервативного участка – ядра, которое отвечает за выполнение той или иной функции подобно природным

рибозимам. При этом важно отметить, что для многих биотехнологических задач ДНКзимы предпочтительнее рибозимов, поскольку ДНК обладает большей химической стабильностью и более низкой стоимостью синтеза, по сравнению с РНК. Для ДНК-наномашин наибольший интерес представляют РНК-расщепляющие ДНКзимы, которые способны расщеплять фосфодиэфирную связь между рибонуклеотидными основаниями. Одним из таких ДНКзимов является ДНК-фермент с каталитическим ядром 10–23. Данный ДНКзим является одним из наиболее охарактеризованных, что служит одной из причин для его широкого применения в составе ДНК-наномашин [10–12].

III. ДНКЗИМНЫЕ СЕНСОРЫ В ДИАГНОСТИКЕ

Первым примером использования ДНКзимов в ДНК-наномашиннах для диагностики является подход, применяемый для детекции нуклеиновых кислот, разработанный коллективом под руководством Элисон Тодд [13]. Авторы предложили использовать в качестве репортерного зонда (пробы) бинарный ДНКзим (бинарный ДНКзимный сенсор) способный расщеплять РНК. Нацелен такой бинарный ДНКзим на расщепление репортерного флуоресцентного зонда (Ф-субстрата), несущего флуоресцентную метку FAM, гаситель флуоресценции и фрагмент РНК, содержащий два рибонуклеотида 5'-GU-3' (рис. 2А) – фрагмент расщепления.

В бинарном ДНКзимном сенсоре, как и в других бинарных гибридационных пробах [14], реакционное ядро ДНКзима разделено на две части. К каждой из частей присоединен домен узнавания аналита (РНК или ДНК интереса) и домен узнавания Ф-субстрата. Таким образом, только при наличии аналита в растворе, две половины бинарного ДНК-сенсора связывают целевую нуклеиновую кислоту и образуют стабильное каталитическое ядро, способное расщеплять Ф-субстрат. В результате расщепления в анализируемом растворе генерируется детектируемый флуоресцентный сигнал за счет пространственного удаления гасителя от флуорофора. Было показано, что четыре разных каталитических ДНКзима: E6, OAP, 10–23 и 8–17 могут быть разделены на две части для диагностических целей [15].

Для удешевления эксперимента флуоресцентный зонд является гибридом РНК-ДНК, где из РНК создан только центральный фрагмент расщепления (два рибонуклеотида), в то время как остальная часть представляет собой участки ДНК с органическим флуорофором и гасителем на концах. Зонд обладает характерной вторичной структурой,

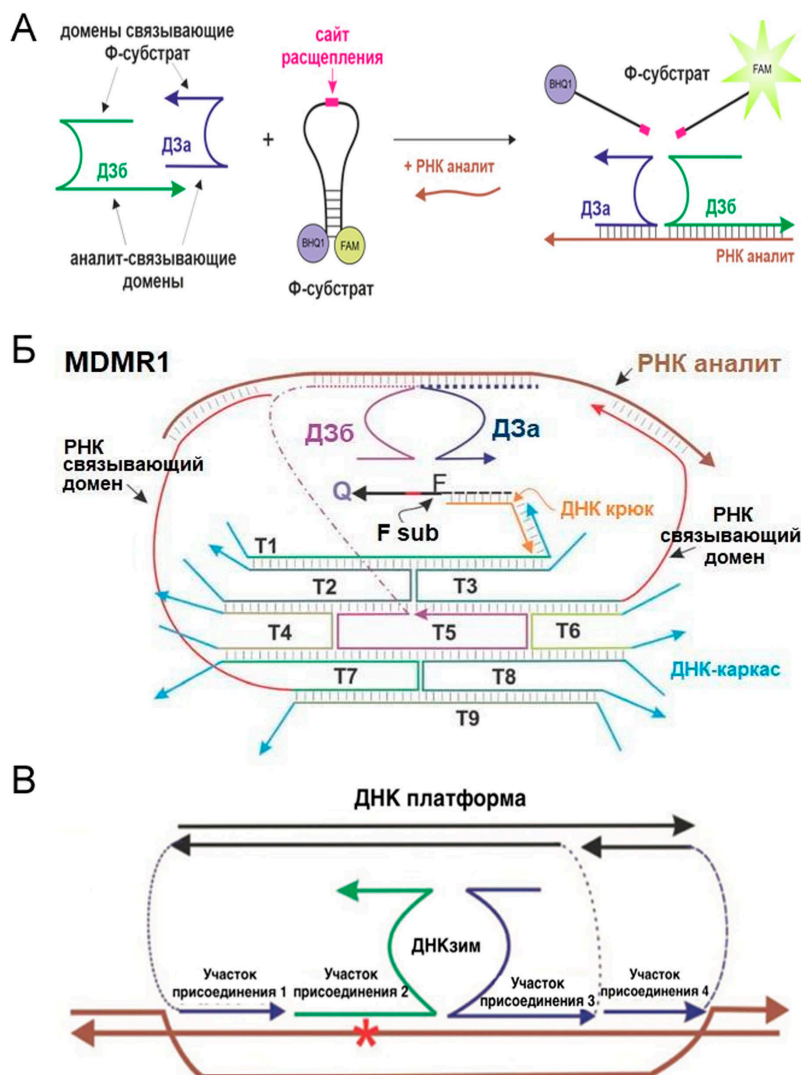


Рис. 2. Схемы ДНК-наносенсоров на основе ДНКзимов для диагностики.

А. Схема бинарного ДНК-наносенсора [13].

Б. Дизайн многофункциональной ДНК-машины для анализа РНК (MDMR1), основанной на биДНКзиме, состоящая из нескольких цепей ДНК тайлов, объединенных в едином ДНК-каркасе [16].

В. Схема ДНК-наносенсора с вытеснением цепи (ДНК-наномашин).

Отдельные элементы конструкции объединенных в едином ДНК-каркасе. Возможные однонуклеотидные несовпадения обозначены на схеме красной звездочкой [17].

при которой флуорофор и гаситель сближены, и значительная часть испущенного света поглощается.

За высокую селективность распознавания аналита бинарным ДНКзимом отвечает короткий аналит-связывающий домен ДЗа. Высокая селективность достигается благодаря тому, что связывание ДЗа возможно только с полностью комплементарной НК мишенью. Наличие хотя бы одного несовпадения приводит к потере стабильности каталитического ядра и, соответственно, отсутствию флуоресцентного сигнала. Домен ДЗб отвечает за высокое сродство бинарного ДНКзима к мишени и подготовку ДНК-наномашинки к посадке ДЗа.

Стоит отметить, что технология с использованием бинарных ДНКзимов имеет ряд преимуществ перед подходом, в котором для детекции используют олигонуклеотидные гибридационные зонды – молекулярные маяки. Так, за счет каталитической активности ДНКзимного ядра, происходит индукция более сильного флуоресцентного сигнала. Использование каталитического этапа подразумевает прогрессирующее накопление флуоресцентного сигнала [13], поскольку после узнавания и расщепления Ф-субстрата, продукты расщепления с легкостью диссоциируют вследствие снижения сродства молекул и свободной энергии Гиббса. Таким образом каталитическое ядро становится доступным для присоединения нового Ф-субстрата. Единоразово собранное ядро способно провести разрезание нескольких молекул, в отличие от классического молекулярного маяка, когда один комплекс при узнавании и связывании производит один сигнал.

Кроме того, значительным преимуществом бинарных ДНКзимных сенсоров над классическими молекулярными маяками является использование универсального Ф-субстрата. Поскольку Ф-субстрат универсален, его можно производить сразу в больших количествах, что удешевляет производство и разработку тест-панелей. Также нет необходимости подбирать сложные, дважды модифицированные зонды для каждого отдельного исследуемого фрагмента. В дополнение, описанный Ф-субстрат обладает тщательно выверенной вторичной структурой, при которой флуорофор и гаситель сближены; при этом в неразрезанном состоянии значительная часть света поглощается. В то время как при подборе молекулярных маячков не всегда удаётся подобрать идеальную вторичную структуру, что, как следствие, приводит к возникновению высокого фонового сигнала и уменьшает чувствительность системы.

Одной из проблем метода детекции нуклеиновых кислот при помощи бинарных сенсоров на основе ДНКзимов является низкая чувствительность, связанная с формированием нуклеиновыми

кислотами сложной вторичной структуры. Поскольку от успешности расплетения вторичных структур зависит эффективность сборки каталитического ядра, одним из подходов для решения данной проблемы является использование повышенной температуры, ослабляющей внутренние связи в молекуле, или, по возможности, тщательный выбор участка для анализа. В этой связи важно, что бинарные ДНК-наносенсоры достаточно успешно работают при применении в условиях повышенной температуры (обычно 55 °С – она также оптимальна для каталитического ядра), ослабляющей внутренние связи в молекуле.

Для повышения вероятности устойчивого присоединения конструкции используют различные подходы. Например, выбор фрагмента узнавания целевой нуклеиновой кислоты (аналита) на стабильной шпильке [18], выбор положения ядра на боковой части шпильки на расстоянии 3–5 нуклеотидов от ее вершины [19], выбор длины расплетающихся фрагментов, такими чтобы они распрямляли шпильку и, при наложении, создавали «липкие концы» [18]. В качестве дополнительного метода для расплетения вторичной структуры аналита используют короткие одноцепочечные фрагменты ДНК – ДНК-усилители, которые присоединяются к детектируемой нуклеиновой кислоте рядом с местами узнавания бинарным ДНК-сенсором [20]. Тем не менее, все эти методы не стали прорывными и позволяли детектировать НК лишь в пределах 10–100 пМ при использовании одноцепочечной ДНК.

МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ ДНК-НАНОМАШИНЫ НА ОСНОВЕ БИНАРНЫХ ДНКЗИМОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для понижения предела чувствительности классического подхода, использующего бинарные ДНКзимы, Д.М. Колпашиковым была предложена идея объединения частей ДНКзима и дополнительных раскручивающих элементов в единую жесткую конструкцию. Таким образом, бинарный ДНКзимный сенсор превратился в полноценную ДНК-наномашину (рис. 2Б) [16]. Такая молекулярная машина для обнаружения РНК молекул (MDMR1) представляет собой ассоциацию нескольких одноцепочечных ДНК молекул, включенных в единый ДНК-каркас. В качестве ДНК-каркаса была использована структура DX-платформ (T1, T2, T3... T9, рис. 2), в качестве ДНК-переключателей были использованы: бинарный ДНКзим (Д3а и Д3б на рис. 2), два дополнительных РНК-связывающих фрагмента и ДНК-крюк для посадки на каркас. Такая конструкция MDMR1 обеспечила способность (1) раскручивать РНК-аналит

с помощью дополнительных РНК-связывающих фрагментов, (2) избирательно распознавать целевой фрагмент РНК при помощи бинарного ДНКзимного сенсора и (3) облегчать доставку Ф-субстрата к каталитическому ядру ДНКзима, за счет использования ДНК-крюка, который увеличивал локальную концентрацию Ф-субстрата возле каталитического ядра. ДНК-наномашинка MDMR1 позволила детектировать 16S рРНК в концентрациях примерно в 24 раза ниже, чем при использовании бинарного ДНКзимного сенсора (8–20 пМ) через 1 час инкубации.

Дальнейшее развитие технологии показало, что такая сложная система является избыточной. Например, простое введение ДНК-каркаса состоящего из двуцепочечной ДНК, которое объединяло в жесткую структуру половину бинарного сенсора с каталитическим ядром и одного или двух аналит-связывающих элементов (Рис. 2В), давало возможность детекции двуцепочечной ДНК [17], продуктов ПЦР амплификации, включая очень длинные (> 1400 пн) [21, 22], целые молекулы РНК вируса [23], или определять значимые однонуклеотидные замены в участках рибосомной РНК, которые не могли быть определены бинарными ДНКзимами [24].

Последующие исследования связаны с возможным усложнением структуры ДНК-наномашин и увеличением чувствительности системы. На сегодняшний день основными вариантами усиления сигнала ДНК-наномашин остается тот или иной каскад реакции. Например, сигнал может быть дополнительно усилен через связывание магнитных частиц, высвобожденными в ходе реакции фрагментами [25], или вовлечение амплификации после проведения первичной детекции [26, 27]. Технологии могут использовать методы детекции сигнала, отличные от флуоресцентного, в том числе сверхточное измерение массы [28] или каскады реакций нуклеиновых кислот [29]. Сложность ДНК-наномашин также увеличивается [30].

Высокий сигнал, создаваемый ДНК-наномашинками позволяет использовать их для детекции НК без амплификации. Важно отметить, что основными преимуществами технологии, использующей ДНК-наносенсоры на основе ДНКзимов, над подходами связанными с амплификацией ДНК методом ПЦР являются:

1. Способность высокоточно определять однонуклеотидные замены в исследуемых последовательностях, вследствие возможности регулировать длины аналит-связывающих элементов;
2. Исключение получения ложных результатов, вследствие внесения полимеразой нежелательных замен в анализируемую нуклеотидную последовательность, в том числе потери значимых замен [31], что мешает точной диагностике.

Разработчики технологии многофункциональной ДНК-машины предложили совместить ее с реакцией ПЦР в реальном времени, как более пластичную замену подхода с использованием молекулярных маяков [32, 33]. ДНК-наносенсоры на основе ДНКзимов остаются не распространены в клинической практике в качестве подхода для диагностики из-за их недостаточно высокой чувствительности по сравнению со всеми методами амплификации. На текущий момент была показана максимальная чувствительность на уровне фемтомоль, которой оказалась достаточно для определения наличия необходимого фрагмента мРНК в общей РНК культуры клеток [30], но недостаточно, для большинства задач клинической диагностики.

Необходимая длительность экспозиции также затрудняет переход технологии в прикладное русло – стандартно в экспериментах, использующих ДНК-наносенсоры время реакции занимает от одного до трёх часов. При этом зачастую это время в дополнение ко времени накопления исследуемого фрагмента (амплификации). Данное ограничение технически может быть решено путём увеличения чувствительности подхода.

Другой проблемой является необходимость поддержания повышенной температуры (55 °С в большинстве случаев), для расплетения вторичных структур и создания оптимальных условия для каталитического ядра. Сейчас ведутся эксперименты, направленные на снижение температуры экспозиции [30].

IV. ДНКЗИМЫ В ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Одним из наиболее перспективных подходов в терапии заболеваний является контроль уровня экспрессии клинически значимых генов. Так, в противоопухолевой терапии активно разрабатываются подходы для выключения (нокдауна) генов, ответственных за развитие опухолевых клеток, или генов, обеспечивающих устойчивость опухолевых клеток к химиотерапии – коррекция посттранскрипционных процессов на уровне РНК. Для этой цели используют олигонуклеотидные агенты – синтетические ДНК и РНК молекулы или их химические аналоги, способные подавлять экспрессию целевого гена посредством инактивации мРНК. Это приводит к ее последующей деградации и прекращению синтеза целевого белка. К таким олигонуклеотидным генно-терапевтическим агентам относятся антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), РНК-интерференционные агенты (малые интерферирующие РНК (миРНК) и микроРНК), а также рибозимы и РНК-расщепляющие ДНКзимы [34]. Уже существует ряд одобренных американским Управлением

по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств или европейским агентством по лекарственным средствам – медицинскими комиссиями по использованию генно-терапевтических препаратов для лечения неопухолевых заболеваний [35]. Также более 20 генно-терапевтических разработок дошли до различных стадий клинических испытаний [34]. При этом, к сожалению, несмотря на огромные усилия и значительный прогресс в исследованиях, на рынке пока не существует олигонуклеотидного агента для лечения опухолевых заболеваний. Основной проблемой остается сложность нацеливания исключительно на опухолевые клетки.

В сравнении с другими генно-терапевтическими агентами, такими как АСО или миРНК, рибозимы и ДНКзимы являются более селективными благодаря высокой избирательности их целевых РНК и независимости от внутриклеточных механизмов расщепления РНК (например, РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (т.н. RISC-комплекс) или РНКазы Н) [36]. Высокая избирательность мишени при использовании рибозимов и ДНКзимов обусловлена тем, что фрагмент, распознающий целевую РНК разделен на две части. Более короткие РНК-связывающие фрагменты (8–10 нт для физиологических условий) по сравнению с АСО и миРНК имеют недостаточную длину для стабильного связывания с нецелевыми мРНК [37], поэтому даже однонуклеотидные замены препятствуют устойчивому формированию каталитического ядра. Независимость от внутриклеточных механизмов освобождает рибозимы и ДНКзимы от побочных эффектов, таких как расщепление РНКазой Н нецелевых мРНК в результате неспецифического связывания с АСО или микроРНК-подобной активности, а также насыщения ферментов, участвующих в синтезе микроРНК, характерного для РНК-интерференционных агентов [36].

На сегодняшний день известно немало попыток применения ДНКзимов в терапии опухолевых заболеваний. Обзор Л.М. Качигяна [38] обобщает данные клинических испытаний всех ДНКзимов, которые применялись для терапии, в том числе онкологических заболеваний. Известные примеры клинических испытаний включают ДНКзим 10–23 «hgd40», нацеленный на РНК, кодирующую основной фактор транскрипции иммунного ответа типа 2 (*GATA-3*), который продемонстрировал эффективность в снижении воспаления при псориазе, астме и хронической обструктивной болезни легких [39–41], а также «Dz13», нацеленный на мРНК гена *C-JUN*, предложенный в качестве цитотоксического агента при ряде неоплазий [38]. Несмотря на кажущуюся перспективность применения ДНКзимов, как простых и программируемых агентов для подавления работы генов, на данный

момент нет данных, подтверждающих существенную эффективность действия препаратов, полученных на их основе. Хотя упорные усилия в использовании ДНКзимов в качестве лекарственных препаратов предпринимались в течение более 20 лет [11, 42, 43]. Отсутствие эффектов от данных препаратов, демонстрирует необходимость привлечения новых, улучшенных стратегий для расщепления РНК.

Основными ограничениями использования ДНКзимов *in vivo* являются: (1) сложность их внутриклеточной доставки, (2) восприимчивость к нуклеазам, (3) зависимость от концентрации кофакторов (ионов металлов), (4) сложности при работе со структурированными РНК-мишенями и (5) неспецифическое подавление целевых мРНК в здоровых клетках.

На решение проблемы внутриклеточной доставки направлены значительные усилия. Так многие ученые пытаются использовать наночастицы на основе липидов и полимеров [44, 45]. Для решения второй и третьей проблемы были разработаны устойчивые к нуклеазам аналоги ДНКзима 10–23: например, содержащий два химически модифицированных нуклеотида в каталитическом ядре [46], высокоактивный аналог с тремя химическими модификациями в последовательности ядра [47] и полностью химически модифицированные ХНАзимы (от лат. «хепо» – иностранный, странный) [48]. Было показано, что модифицированные искусственными нуклеозидами каталитические ядра обладают способностью расщеплять целевые РНК во внеклеточных системах, а также подавлять экспрессию целевых генов в клетках.

Для решения четвертой и пятой проблемы исследовательская группа под руководством Д.М. Колпащикова предложила разработать ДНК-наномашину на основе бинарного ДНКзима, используемого в диагностике. Такая наномашина потенциально способна увеличить доступность сайта узнавания РНК-мишени, за счет раскручивания ее вторичной структуры при помощи дополнительных РНК-связывающих фрагментов, также активировать расщепление целевой мРНК только в присутствии маркерной последовательности за счет использования бинарного ДНКзимного ядра, собирающегося только при условии наличия двух мРНК – и маркерной, и целевой [49]. Применение данного подхода было связано с успехами схожих по строению бинарных ДНКзимов в разработке диагностических ДНК-наномашин. Высокая селективность распознавания аналитов и прочное связывание РНК-мишеней, несмотря на их стабильные вторичные структуры, обещали обеспечить эффективную платформу для внутриклеточного распознавания и связывания РНК-мишеней.

МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ ДНК-НАНОМАШИНЫ
ДЛЯ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Используя известные принципы разработки ДНКзимных наномашин для диагностических целей, исследовательская группа под руководством Д.М. Колпашикова, сконструировала ДНК-наномашину, нацеленную на расщепление мРНК белка *DAD1* (ген защитник от апоптоза 1) в присутствии участка мРНК гена *N-MYC* который активно транскрибируется в клетках нейробластомы [50]. Для обеспечения высокой аффинности ДНКзима, кроме элемента узнавания *N-MYC* и узнавания и разрезания *DAD1*, ДНК-наномашина содержала дополнительные РНК-связывающие элементы, нацеленные на расплетение вторичной структуры мРНК гена *DAD1* (рисунок 3). Разработанная ДНК-наномашина состояла из трех цепей ДНК (Т1, Т2 и Т3), которые были объединены в небольшой двуцепочечный ДНК-каркас. Цепь Т1 содержала дополнительные РНК-связывающие фрагменты. Цепь Т2 включала в себя половину бинарного ДНКзима, в то время как вторая половина ДНКзима (ДЗб) оставалась несвязанной в растворе. Такая конструкция обеспечивала следующие функции: 1) распознавание последовательности опухолевого маркера (мРНК гена *N-MYC*); 2) связывание и раскручивание вторичной структуры РНК-мишени (мРНК гена *DAD1*) с помощью дополнительных элементов; 3) связывание и распознавание сайта расщепления РНК-мишени с высокой селективностью; и 4) расщепление РНК-мишени при помощи каталитического ядра ДНКзима 10–23.

В результате проведенных исследований авторами было продемонстрировано, что ДНК-наномашина может распознавать как маркерную последовательность, так и РНК-мишень с высокой селективностью в условиях, близких к физиологическим.

Важной особенностью ДНК-наномашин является возможность комбинировать ранее разработанные подходы. Так, в следующей ДНК-наномашине было объединено два подхода: создание сигнала о наличии целевой РНК в клетке или растворе (диагностическая функция) и расщепление этой РНК (терапевтическая функция) в одной тераностической (от «терапия и диагностика») конструкции (рис. 4А) [51]. В таком случае, тераностическая ДНК-наномашина содержит нескольких коротких РНК-связывающих элементов и два каталитических ядра ДНКзима 10–23, объединенных коротким двуцепочечным ДНК-каркасом. Терапевтическую функцию выполняет классический цельный ДНКзим, который нацелен на расщепление целевой РНК мишени; диагностическую функцию выполняет бинарный ДНКзим, нацеленный на расщепление Ф-субстрата в

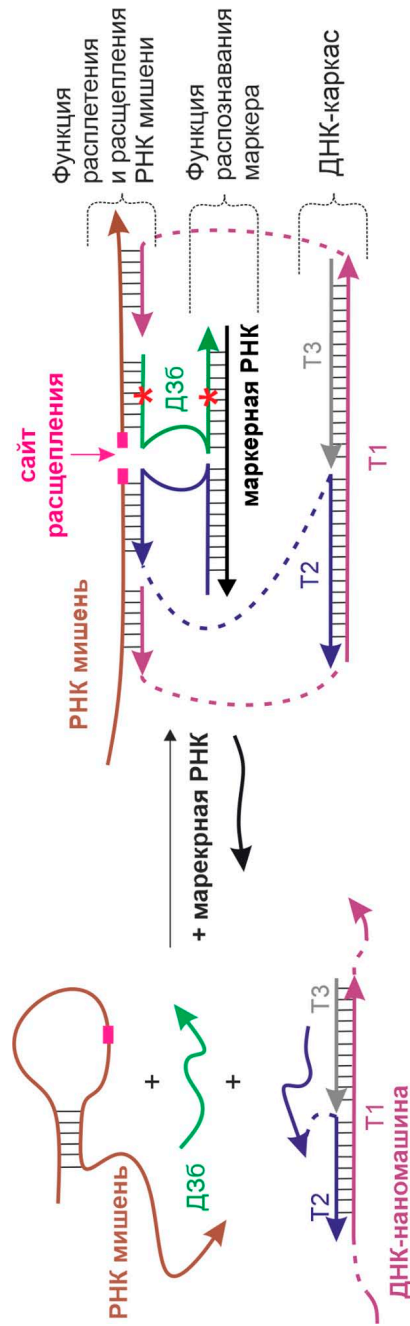


Рис. 3. ДНК-наномашина для терапии опухолевых заболеваний. Объяснение в тексте [50].

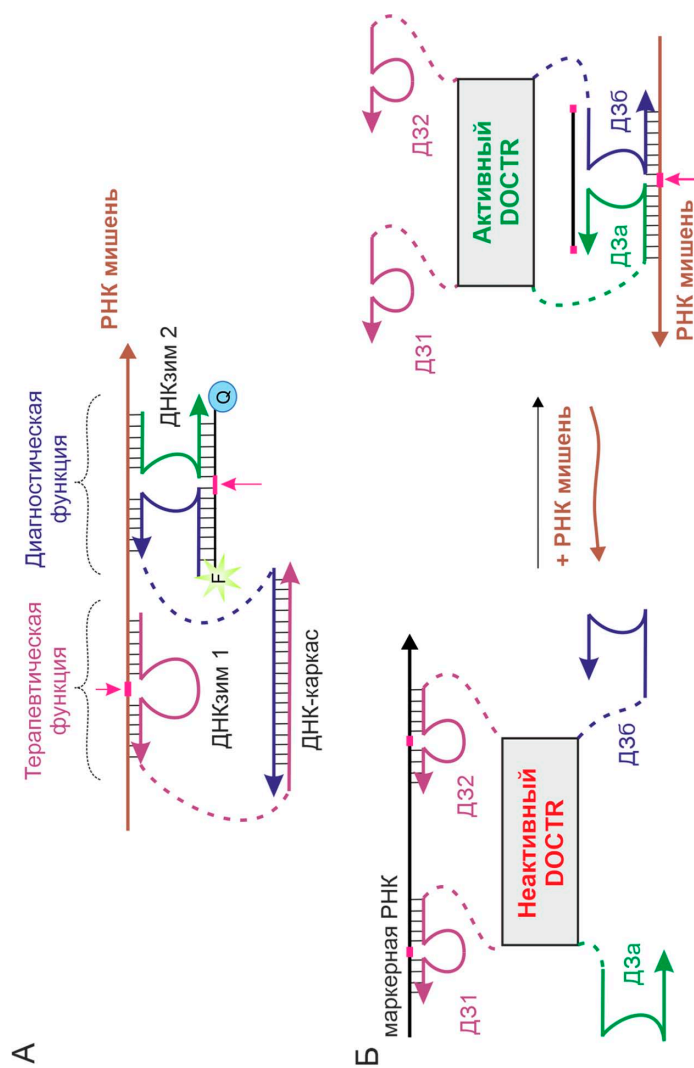


Рис. 4. Примеры сложных ДНК-наномашин.
 (А) Терапевтическое ДНК-устройство, обладает терапевтической функцией и диагностической функцией [51].
 (Б) ДНКзимный наноробот (DOCTR), управляемый при помощи ДНКзимов и нацеленный на опухолевый маркер и РНК мишень [52].
 Объяснение в тексте.

присутствии РНК-мишени (рисунок 5А). Оба ДНКзимных кора присоединены к разным цепям ДНК-каркаса, что обеспечивает их совместное связывание с целевой мРНК. Объединение фрагментов ДНК-наномашин в единую конструкцию обеспечило увеличение сродства тераностической ДНК-наномашин к РНК и привело к улучшению эффективности расщепления целевой РНК за счет раскрытия ее вторичной структуры [96].

Важным условием активности ДНК-наномашин в клетках является возможность встречи маркерной последовательности и целевой РНК вблизи друг от друга. Для обеспечения такой возможности была предложена концепция усложненной ДНК-наномашин – ДНК-наноробота (DOCTR) (рис. 4Б) [52], который состоит из двух цельных ДНКзимов (ДЗ1 и ДЗ2), расщепляющих онкомаркерную последовательность и выщепляющих кусок, который может переместиться вместе с DOCTR и активировать бинарный ДНКзим (ДЗа и ДЗб) в присутствии мРНК гена домашнего хозяйства, разрушая последний (рисунок 4Б). Все три ДНКзимных ядра прикреплены к единому ДНК-каркасу. Прототип DOCTR способен высокоселективно распознавать фрагмент РНК опухолевого маркера, вырезать короткий фрагмент, который соединяет фрагменты ДЗа и ДЗб, и активировать каталитическое ядро бинарного ДНКзима для расщепления РНК мишени гена домашнего хозяйства. Ожидается, что «активный» DOCTR может свободно мигрировать внутрь клеток в поисках РНК-мишеней вместе с выщепленным фрагментом маркерного гена. При встрече с целевой РНК-мишенью активное ядро ДНКзима будет ее беспрепятственно расщеплять [97].

В качестве маркерной последовательности для активации расщепления целевых мРНК могут быть использованы не только мРНК опухолевых генов, но и микроРНК. Их небольшой размер (до 30 нт) и высокая специфичность для определенных типов опухолей, делает их привлекательными для активации ДНК-наномашин. Следует отметить, что многие микроРНК синтезируются как в опухолевых, так и в здоровых клетках, но в разных количествах. Для обеспечения активации ДНКзима исключительно при высоких концентрациях опухолевой микроРНК был разработан бинарный ДНКзим с порогом чувствительности (т.н. «пороговое ДНК-устройство») на основе логического оператора «Да» (Рис. 5А) [53]. В данной разработке цепи бинарного ДНКзима ДЗа и ДЗб в неактивном состоянии представляют собой шпильки, которые блокируют доступ к формированию активного каталитического ядра. Раскрытие шпилек обеспечивается связыванием микроРНК, которая также способна собирать

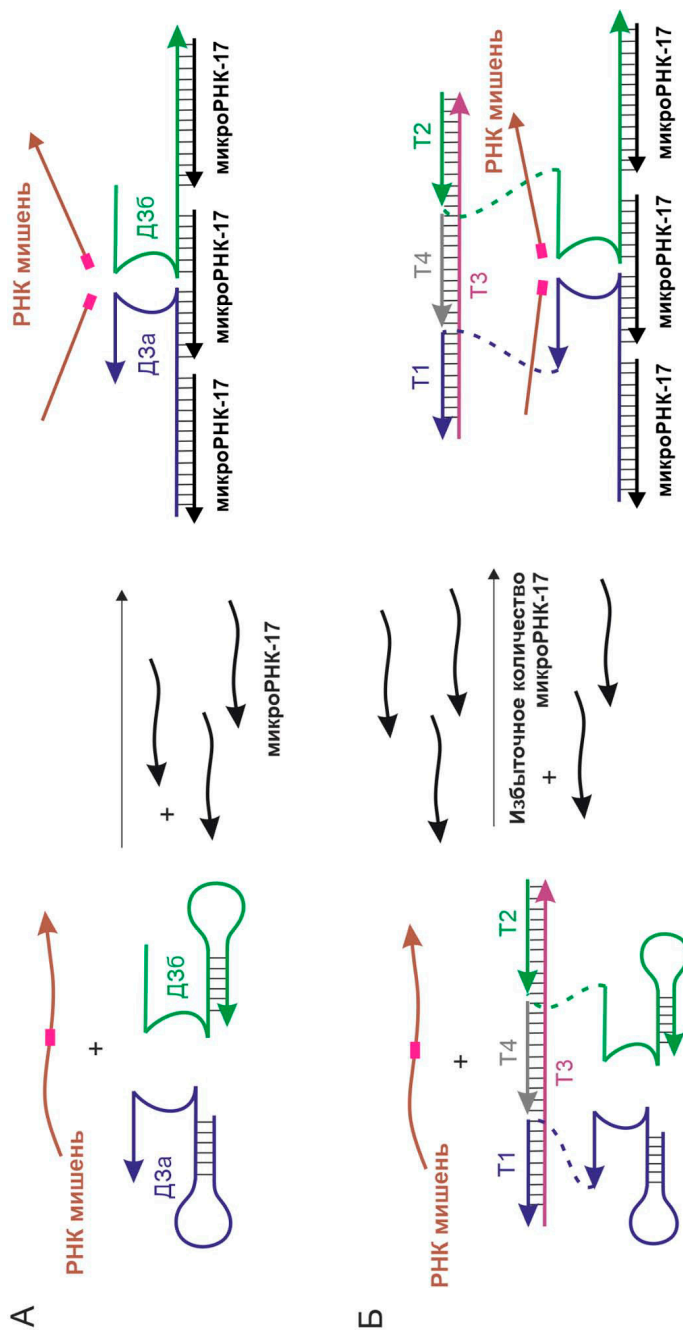


Рис. 5. Схема ДНК-устройств для обеспечения пороговой чувствительности к мишени микроРНК-17.

(А) Бинарное пороговое ДНК-устройство.

(Б) Пороговая ДНК-наномашина. Объяснение в тексте. [54]

каталитическое ядро ДНКзима воедино. Таким образом, пороговое ДНК-устройство расщепляет РНК-мишени только при высоких концентрациях микроРНК (около 200 нМ) и демонстрирует низкую активность при низких концентрациях маркера (менее 100 нМ). Кроме того, такое ДНК-устройство можно отрегулировать реагировать в пределах одного порядка концентрации, изменив конструкцию и увеличив количество фрагментов присоединения микроРНК [53].

Активность порогового ДНК-устройства снижалась в присутствии очень высоких концентраций маркерной микроРНК (более 400 нМ), поскольку при высоких концентрациях вместо одной микроРНК в центре ДНК-устройства, есть шанс на присоединение двух отдельных микроРНК к каждой половине, и происходит пространственное ингибирование соединения Д3а и Д3б. Для решения этой проблемы две цепи бинарного ДНКзима в ДНК-устройстве были объединены на одном ДНК-каркасе, что привело к получению «пороговой ДНК-наномашин» (Рис. 5Б) [54]. Пороговая ДНК-наномашин продемонстрировала поддержание высокого уровня активности расщепления целевой РНК в присутствии повышенных концентраций маркерной микроРНК-17, а также обеспечила двойное увеличение активности по сравнению со свободным бинарным ДНКзимом. Такое значительное увеличение активности стало возможным за счет пространственного сближения цепей Д3а и Д3б в двуцепочечном ДНК-каркасе; что повысило кооперативность системы [54]. Кроме того, оба пороговых устройства обеспечили высокую селективность распознавания, так использование в качестве маркера микроРНК, отличающейся всего на два нуклеотида, не приводило к расщепления целевой РНК.

Важно отметить, что описанные выше ДНК-наномашин, разработанные для терапии опухолевых заболеваний, продемонстрировали свою высокую эффективность и селективность на синтетических РНК в условиях близких к физиологическим, но их эффективность пока не была подтверждена *in vivo*. Одним из основных ограничений использования ДНК-наномашин в терапии по-прежнему является сложность их эффективной доставки до желаемых клеток или тканей, а также до целевых фрагментов нуклеиновых кислот с сохранением стабильности. Успех использования ДНК-наномашин в терапии также во многом будет зависеть от разработки эффективных методов доставки и химических модификаций, предотвращающих разрушение ДНК на пути к целевым клеткам.

Возможность использования ДНК-наномашин в клеточных культурах была продемонстрирована в 2021 году учеными из Хунаньского

университета. Они показали, что «нанопинцет» на основе бинарного ДНКзима способен подавлять экспрессию мРНК гена BIRC5, кодирующего сурвивин, только в опухолевых клетках с высокой экспрессией маркера роста опухоли – мРНК гена тимидинкиназы [55]. Кроме того, расщепление целевой мРНК сурвивина привело к индукции апоптоза в опухолевых клетках.

Таким образом, ДНК-наномашинны являются многообещающими прототипами молекулярных устройств для направленного контроля экспрессии генов и лечения заболеваний. Разделение функции распознавания опухолевых маркеров от функции расщепления РНК в разных модулях ДНК-наномашинны потенциально может обеспечить активность только в опухолевых клетках, приводя к значительному увеличению эффективности генно-терапевтических агентов и уменьшению негативных эффектов от препарата.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка наномашин на основе ДНК привлекает исследователей из разных областей науки уже многие десятилетия благодаря легкости синтеза и возможности точного предсказания ДНК структур с заданными характеристиками. Вскоре после открытия РНК-расщепляющих ДНКзимов они также стали важным элементом в ДНК-технологии, поскольку открыли возможность создавать каталитические логические системы, детектировать НК с высоким сигналом и управлять экспрессией генов на уровне мРНК. Многие десятилетия ученые разрабатывали подходы для усиления сигнала диагностических и повышения эффективности терапевтических ДНК-наномашин. Концептуальный прорыв, который может позволить ввести ДНКзимы в биотехнологическую практику, был сделан группой под руководством Д.М. Колпашикова. Исследователями была создана концепция объединения отдельных частей бинарных ДНКзимов в единый пространственный ДНК-каркас [17]. Совмещение элементов ДНК-наномашинны в пространстве позволило уменьшить предел обнаружения нуклеиновых на три порядка за счет синергии каталитического ядра и системы расплетения вторичной структуры НК. Последующие структурные изменения ДНК-наномашин позволили еще больше усилить сигнал и уменьшить время его получения. Полученный результат может в перспективе позволить совершить прорыв в создании диагностических тест-систем на основе ДНК-наномашин для клинической практики.

Кроме того, использование ДНК-наномашин на основе бинарных ДНКзимов является интересным подходом для терапии онкологических заболеваний, поскольку открывает возможность высокоселективного нацеливания терапевтического агента исключительно на опухолевые клетки. Концепция пространственного объединения элементов бинарного ДНКзима в ДНК-наномашину продемонстрировала увеличение как селективности, так и эффективности ДНКзимной системы в расщеплении биологических РНК. В дополнение ДНК-каркас удобен для внесения различных элементов управления, например, для запуска терапевтической активности только в условиях высоких концентраций маркерных последовательностей, что особенно важно для применения лекарства только в пораженных клетках и снижения побочных эффектов.

Сейчас ДНК-наномашин на основе РНК-расщепляющих ДНКзимов наиболее активно исследуются в лабораториях из Китая. Среди активных представителей области можно назвать Ж.-Х. Жианга и С.-Б. Жанга из университета Хунаня [56, 57]. В России несколько групп из Москвы (МГУ, ФМБА), Санкт-Петербурга (ИТМО, НИИ Пастера) и Новосибирска (ИХБФМ, НПО Вектор, НГУ) занимаются прежде всего разработкой ДНК-наномашин на основе пероксидазоподобного ДНКзима. Стоит отметить группу под руководством И.Ю. Сахарова (кафедра химической энзимологии, химического факультета МГУ) [58] и лабораторию под руководством М.А. Воробьевой (ИХБФМ) [59] поскольку их исследования РНК-расщепляющих ДНКзимов начавшиеся около 10 лет назад внесли значительный вклад в развитие данной области, как в России, так и за рубежом. В настоящее время отдельные группы также начинают исследования ДНКзимов, используя новые достижения в области использования жесткого ДНК-каркаса [60].

Будущее применения ДНК-наномашин в биотехнологии и медицине кажется обнадеживающим. Разработка новых методов для повышения чувствительности бинарных ДНКзимов, разработка эффективных методов доставки и защиты НК, а также рациональное объединение новых функциональных элементов в конструкции открывают возможность использования ДНК-наномашин для создания диагностических тест-систем без использования белков, а также для разработки новых методов лечения онкологических заболеваний. При этом крайне важно, перед широким внедрением ДНК-наномашин в терапевтическую практику провести дальнейшие исследования и проверку их эффективности *in vivo* и в клинических испытаниях.

В целом разработка ДНКзимных ДНК-наномашин представляет собой важное звено перехода от устаревающих подходов диагностики и терапии к персонализированной современной медицине. Это может осуществить прорыв в молекулярной биологии и привести к созданию новых инновационных технологий и лекарств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu W., Duan H., Zhang D., Zhang X., Luo Q., Xie T., Yan H., Peng L., Hu Y., Liang L., Zhao G., Xie Z. (2021) Concepts and Application of DNA Origami and DNA Self-Assembly: A Systematic Review. *Applied bionics and biomechanics*, **2021**, 9112407.
2. Zhang F., Nangreave J., Liu Y., Yan H. (2014) Structural DNA nanotechnology: state of the art and future perspective. *Journal of American Chemical Society*, **136**, 11198–11211.
3. Nummelin S., Kommeri J., Kostianen M.A., Linko V., Zhang F., Nangreave J., Liu Y., Yan H. (2014) Structural DNA nanotechnology: state of the art and future perspective. *Advanced Materials*, **30**, 1703721.
4. Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3406–3415.
5. Zadeh J.N., Steenberg C.D., Bois J.S., Wolfe B.R., Pierce M.B., Khan A.R., Dirks R.M., Pierce N.A. (2011). NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *Journal of Computational Chemistry*, **32**, 170–173.
6. Shen L., Wang P., Ke Y. (2021) DNA Nanotechnology-Based Biosensors and Therapeutics. *Advanced Healthcare Materials*, **10**, 2002205.
7. Gong L., Zhao Z., Lv Y.F., Huan S.Y., Fu T., Zhang X.B., Shen G.L., Yu R.Q. (2015) DNAzyme-based biosensors and nanodevices. *Chemical Communication*, **51**, 979–995.
8. Gugliotti L.A., Feldheim D.L., Eaton B.E., Serganov A., Keiper S., Malinina L., Tereshko V., Skripkin E., Höbartner C., Polonskaia A. (1992) DNAzyme-based biosensors and nanodevices. *Science*, **2**, 982–994.
9. Breaker R.R., Joyce G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chemical Biology*, **1**, 223–229.
10. Santoro S.W., Joyce G.F. (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proceedings of National Academy of Science*, **94**, 4262–4266.
11. Fokina A.A., Stetsenko D.A., François J.C. (2015) DNA enzymes as potential therapeutics: towards clinical application of 10-23 DNAzymes. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **15**, 689–711.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ. Д.Д. Недорезова – написание основного корда текста статьи; М.С. Рубель, А.А. Рубель – написание и редактирование текста статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ. Авторы благодарят Д.М. Колпащикова и Е.И. Кошель за обсуждение и важные замечания. Авторы также благодарят РЦ «Хромас» и РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ за техническую поддержку.

12. Cairns M.J., King A., Sun L. (2003) Optimisation of the 10–23 DNAzyme–substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine–cytosine target sites. *Nucleic Acids Research*, **31**, 2883–2889.
13. Mokany E., Bone S.M., Young P.E., Doan T.B., Todd A.V. (2010) MNAzymes, a versatile new class of nucleic acid enzymes that can function as biosensors and molecular switches. *Journal of American Chemical Society*, **132**, 1051–1059.
14. Kolpashchikov D.M. (2007) A binary deoxyribozyme for nucleic acid analysis. *ChemBioChem*, **8**, 2039–2042.
15. Kolpashchikov D.M. (2010) Binary probes for nucleic acid analysis. *Chemical Review*, **110**, 4709–4723.
16. Cox A.J., Bengtson H.N., Rohde K.H., Kolpashchikov D.M. (2016) DNA nanotechnology for nucleic acid analysis: multifunctional molecular DNA machine for RNA detection. *Chemical Communication*, **52**, 14318–14321.
17. Lyalina T.A., Goncharova E.A., Prokofeva N.Y., Voroshilina E.S., Kolpashchikov D.M. (2019) A DNA minimachine for selective and sensitive detection of DNA. *Analyst*, **144**, 416–420.
18. Grimes J., Gerasimova Y. V., Kolpashchikov D.M. (2010) Real-time SNP analysis in secondary structure-folded nucleic acids. *Angewandte Chemie*, **122**, 9134–9137.
19. Gerasimova Y. V., Kolpashchikov D.M. (2013) Detection of bacterial 16S rRNA using a molecular beacon-based X sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **41**, 386–390.
20. Horn S., Schwenzler B. (1999) Oligonucleotide facilitators enhance the catalytic activity of RNA-cleaving DNA enzymes. *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, **9**, 465–472.
21. Kovtunov E.A., Shkodenko L.A., Goncharova E.A., Nedorezova D.D., Sidorenko S.V., Koshel E.I., Kolpashchikov D.M. (2019) Towards Point of Care Diagnostics: Visual Detection of Meningitis Pathogens Directly from Cerebrospinal Fluid. *ChemistrySelect*, **4**, 14572–14577.
22. Akhmetova M.M., Rubel M.S., Afanasenko O.S., Kolpashchikov D.M. (2022) Barley haplotyping using biplex deoxyribozyme nanomachine. *Sensors and Actuators Reports*, **4**, 100132.
23. El-Deeb A.A., Zablotskaya S.S., Rubel M.S., Nour M.A.Y., Kozlovskaya L.I., Shtro A.A., Komissarov A.B., Kolpashchikov D.M. (2022) Toward a Home Test for COVID-19 Diagnosis: DNA Machine for Amplification-Free SARS-CoV-2 Detection in Clinical Samples. *ChemMedChem*, **17**, e202200382.
24. Ateiah M., Gandalipov E.R., Rubel A.A., Rubel M.S., Kolpashchikov D.M. (2023) DNA Nanomachine (DNM) Biplex Assay for Differentiating *Bacillus cereus* Species. *International Journal of Molecular Science*, **24**, 4473.
25. Tian B., Han Y., Wetterskog E., Donolato M., Hansen M.F., Svedlindh P., Strömberg M. (2018) MicroRNA detection through DNAzyme-mediated disintegration of magnetic nanoparticle assemblies. *ACS Sensors*, **3**, 1884–1891.
26. Yang J., Tang M., Diao W., Cheng W., Zhang Y., Yan Y. (2016) Electrochemical strategy for ultrasensitive detection of microRNA based on MNzyme-mediated rolling circle amplification on a gold electrode. *Microchimica Acta*, **183**, 3061–3067.
27. Hong C., Kim D.M., Baek A., Chung H., Jung W., Kim D.E. (2015) Fluorescence-based detection of single-nucleotide changes in RNA using graphene oxide and DNAzyme. *Chemical Communication*, **51**, 5641–5644.
28. Peeters B., Daems D., Van der Donck T., Delpont F., Lammertyn J. (2019)

- Real-time FO-SPR monitoring of solid-phase DNAzyme cleavage activity for cutting-edge biosensing. *ACS Applied Material Interfaces*, **11**, 6759–6768.
29. Ren K., Wu J., Ju H., Yan F. (2015) Target-driven triple-binder assembly of MNAzyme for amplified electrochemical immunosensing of protein biomarker. *Analytical Chemistry*, **87**, 1694–1700.
30. Rubel M., Zablotskaya S., Pokatova O., El-Deeb A., Ateiah M., Gorbenko D., Shkodenko L., Kolpashchikov D.M. (2022) DNA-nanomachines for nucleic acid detection. *Proceedings of the Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022)*, 355.
31. Goodman M.F., Fygenon D.K. (1998) DNA polymerase fidelity: from genetics toward a biochemical understanding. *Genetics*, **148**, 1475–1482.
32. Mokany E., Todd A. V. (2013) MNAzyme qPCR: A Superior Tool for Multiplex qPCR. *Nucleic Acid Detection: Methods and Protocols.* / Ред. D.M. Kolpashchikov, Y. V. Gerasimova. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 31–49.
33. Tan L.Y., Walker S.M., Lonergan T., Lima N.E., Todd A. V., Mokany E. (2017). Superior Multiplexing Capacity of PlexPrimers Enables Sensitive and Specific Detection of SNPs and Clustered Mutations in qPCR. *PLoS one*, **12**, e0170087.
34. Xiong H., Veedu R.N., Diermeier S.D. (2021) Recent Advances in Oligonucleotide Therapeutics in Oncology. *International Journal of Molecular Science*, **22**, 3295
35. Ma C.C., Wang Z.L., Xu T., He Z.Y., Wei Y.Q. (2020) The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnology Advanced*, **40**, 107502.
36. Nedorezova D.D., Dubovichenko M.V., Belyaeva E.P., Grigorieva E.D., Peresadina A.V., Kolpashchikov D.M. (2022) Specificity of oligonucleotide gene therapy (OGT) agents. *Theranostics*, **12**, 7132–7157.
37. Demidov V.V., Frank-Kamenetskii M.D. (2004) Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends in Biochemical Science*, **29**, 62–71.
38. Khachigian L.M. (2019) Deoxyribozymes as Catalytic Nanotherapeutic Agents. *Cancer Research*, **79**, 879–888.
39. Purath U., Ibrahim R., Zeitvogel J., Renz H., Runkel F., Schmidts T., Dobler D., Werfel T., Müller A., Garn H. (2016) Efficacy of T-cell transcription factor-specific DNAzymes in murine skin inflammation models. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **137**, 644–647.
40. Garn H., Renz H. (2017) GATA-3-specific DNAzyme - A novel approach for stratified asthma therapy. *European Journal of Immunology*, **47**, 22–30.
41. Greulich T., Hohlfeld J.M., Neuser P., Lueer K., Klemmer A., Schade-Brittinger C., Harnisch S., Garn H., Renz H., Homburg U., Renz J., Kirsten A., Pedersen F., Muller M., Vogelmeier C.F., Watz H. (2018) A GATA3-specific DNAzyme attenuates sputum eosinophilia in eosinophilic COPD patients: a feasibility randomized clinical trial. *Respiratory Research*, **19**, 55.
42. Fokina A.A., Chelobanov B.P., Fujii M., Stetsenko D.A. (2017) Delivery of therapeutic RNA-cleaving oligodeoxyribonucleotides (deoxyribozymes): from cell culture studies to clinical trials. *Expert Opinion in Drug Delivery*, **14**, 1077–1089.
43. Zhang J. (2018) RNA-Cleaving DNAzymes: Old Catalysts with New Tricks for Intracellular and In Vivo Applications. *Catalysts*, **8**, 550.
44. Xiao Y., Shi K., Qu Y., Chu B., Qian Z. (2019) Engineering Nanoparticles for Targeted Delivery of Nucleic Acid

- Therapeutics in Tumor. *Molecular Therapy - Methods in Clinical Development*, **12**, 1–18.
45. Larcher L.M., Pitout I.L., Keegan N.P., Veedu R.N., Fletcher S. (2023) DNAzymes: Expanding the Potential of Nucleic Acid Therapeutics. *Nucleic Acid Therapy*, **33**, 178–192.
46. Wang Y., Nguyen K., Spitale R.C., Chaput, J.C. (2021) A biologically stable DNAzyme that efficiently silences gene expression in cells. *Nature Chemistry*, **13**, 319–326.
47. Nguyen K., Malik T.N., Chaput J.C. (2023) Chemical evolution of an autonomous DNAzyme with allele-specific gene silencing activity. *Nature Communication*, **14**, 2413.
48. Taylor A.I., Wan C.J.K., Donde M.J., Peak-Chew S.-Y., Holliger P. (2022) A modular XNAzyme cleaves long, structured RNAs under physiological conditions and enables allele-specific gene silencing. *Nature Chemistry*, **14**, 1295–1305.
49. Nedorezova D.D., Fakhardo A.F., Molden T.A., Kolpashchikov D.M. (2020) Deoxyribozyme-Based DNA Machines for Cancer Therapy. *ChemBioChem*, **21**, 607–611.
50. Nedorezova D.D., Fakhardo A.F., Nemirich D. V., Bryushkova E.A., Kolpashchikov D.M. (2019) Towards DNA Nanomachines for Cancer Treatment: Achieving Selective and Efficient Cleavage of Folded RNA. *Angewandte Chemie International Edition*, **58**, 4654–4658.
51. Spelkov A.A., Goncharova E.A., Savin A.M., Kolpashchikov D.M. (2020) Bifunctional RNA-Targeting Deoxyribozyme Nanodevice as a Potential Theranostic Agent. *Chemistry*, **26**, 3489–3493.
52. Molden T.A., Niccum C.T., Kolpashchikov D.M. (2020) Cut and Paste for Cancer Treatment: A DNA Nanodevice that Cuts Out an RNA Marker Sequence to Activate a Therapeutic Function. *Angewandte Chemie International Edition*, **59**, 21190–21194.
53. Stojanovic M.N., Mitchell T.E., Stefanovic D. (2002) Deoxyribozyme-Based Logic Gates. *Journal of American Chemical Society*, **124**, 3555–3561.
54. Gomes de Oliveira A.G., Dubovichenko M. V., ElDeeb A.A., Wanjohi J., Zablotskaya S., Kolpashchikov D.M. (2021) RNA-Cleaving DNA Thresholder Controlled by Concentrations of miRNA Cancer Marker. *ChemBioChem*, **22**, 1750–1754.
55. He M., He M., Nie C., Yi J., Zhang J., Chen T., Chu X. (2021) mRNA-Activated Multifunctional DNAzyme Nanotweezer for Intracellular mRNA Sensing and Gene Therapy. *ACS Applied. Material Interfaces*, **13**, 8015–8025.
56. Huang Z., Wang X., Wu Z., Jiang J.-H. (2022) Recent Advances on DNAzyme-Based Sensing. *Chemistry. An Asian Journal*, **17**, e202101414.
57. Wang, B., Wang, M., Peng, F., Fu X., Wen M., Shi Y., Chen M., Ke G., Zhang X.-B. (2023) Construction and Application of DNAzyme-based Nanodevices. *Chemistry Research in Chinese Universities*, **39**, 42–60.
58. Бодулев О.Л., Грибас А.В., Вдовенко М.М., Сахаров И.Ю. (2018) Хемилюминесцентная детекция ДНК ВИЧ на основе аллостерической активации пероксидазаподобного ДНКзима. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, **59**, 78–84.
59. Воробьева М. А., Давыдова А. С., Веньямина А. Г. (2011) Искусственные рибозимы «головка молотка»: дизайн и применение. *Успехи химии*, **80**, 139–156.
60. Kirichenko A., Bryushkova E., Dedkov V., Dolgova A. (2023) A Novel DNAzyme-Based Fluorescent Biosensor for Detection of RNA-Containing Nipah Henipavirus. *Biosensors (Basel)*, **13**, 252.