



УДК 577.21

ДИЗАЙН И ВАЛИДАЦИЯ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГАНКИРИНА В ПЕЧЕНИ МЫШИ

© 2021 г. Т. А. Приказчикова*, Т. О. Абакумова*, О. В. Сергеева*.,# , Т. С. Зацепин*.,**

*Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205 Москва, Большой б-р, 30, стр. 1

**ФГБУН “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 04.10.2020 г.

Несмотря на успехи последних лет в лечении гепатоклеточной карциномы и других онкологических заболеваний печени, разработка новых подходов к терапии этих заболеваний остается актуальной задачей. Применение терапевтических нуклеиновых кислот дает возможность подавлять в течение длительного времени “сложные” мишени, а также успешно реализовывать комплексную терапию с малыми молекулами и антителами. Одной из привлекательных мишеней для лечения гепатоклеточной карциномы является ганкирин – белок, активно участвующий в росте, пролиферации и инвазии клеток, в том числе опухолевых. Было показано, что уровень ганкирина повышается в процессе канцерогенеза и играет значительную роль в росте и метастазировании опухоли. В рамках данной работы нами были проведены дизайн, синтез и валидация *in vitro* и *in vivo* малых интерферирующих РНК (siРНК) для подавления экспрессии ганкирина. По результатам трансфекции клеток и последующей оценки количества мРНК ганкирина в гепатоцитах мыши AML12 были отобраны три из семи синтезированных siРНК (степень ингибирования до 80%). Согласно результатам моделирования вторичной структуры мРНК ганкирина мыши, данные siРНК комплементарны фрагментам мРНК, содержащим в своей структуре одновременно одно- и двуцепочечные участки. Эффективность отобранных siРНК была также изучена в экспериментах на мышцах линии BALB/C, было показано, что siРНК в составе липидных частиц подавляли экспрессию мРНК ганкирина более чем на 90% при однократной инъекции 0.2 мг/кг. Полученные siРНК могут быть использованы для изучения роли ганкирина в развитии ряда онкологических и метаболических заболеваний на моделях животных.

Ключевые слова: малые интерферирующие РНК, печень, ганкирин, РНК-интерференция

DOI: 10.31857/S0132342321020226

ВВЕДЕНИЕ

Разнообразные злокачественные образования печени входят в десятку самых распространенных онкологических заболеваний. Высокая функциональность печени даже на поздних стадиях развития гепатоклеточной карциномы, холангиокарциномы и других онкологических заболеваний затрудняет своевременную диагностику, поэтому часто единственным вариантом лечения остается резекция и пересадка печени. Несмотря на успехи хирургических подходов, лекарственная терапия предпочтительна из-за меньших рисков для пациентов.

При развитии рака печени изменяется экспрессия многих генов, которые могут выступать в

качестве потенциальных мишеней для терапии и диагностики [1, 2]. Одним из основных онкогенов, вызывающих повышенную пролиферацию гепатоцитов, является малая субъединица 26S протеасомы, отвечающей за расщепление белков – ганкирин. Ганкирин состоит из семи тандемно расположенных аминокислотных повторов (анкириновых повторов) и синтезируется практически во всех эукариотических клетках [3]. Повышенный уровень ганкирина в гепатоцитах мыши приводит к увеличению деградации супрессоров канцерогенеза, в том числе семейства транскрипционных факторов СЕВР. Также увеличение уровня ганкирина приводит к индукции гемангиомы за счет активации белка HIF-1, что свидетельствует о роли ганкирина в ответе на гипоксию в дополнение к его функциям онкобелка [4]. Все перечисленные свойства делают ганкирин привлекательным маркером и потенциальной мишенью для терапии гепатоклеточной карциномы.

Сокращения: siРНК – малые интерферирующие РНК; микроРНК – малые некодирующие РНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (926) 388-08-65; эл. почта: o.sergeeva@skoltech.ru).

В настоящее время разрабатываются различные подходы к снижению экспрессии ганкирина в раковых клетках. Известны малые молекулы и пептиды, ингибирующие связывание ганкирина с рядом белков-партнеров [5, 6], однако эти ингибиторы обладают ограниченной эффективностью за счет блокирования только части функций ганкирина. Альтернативным решением является подавление экспрессии мРНК ганкирина с использованием терапевтических нуклеиновых кислот [7]. Одним из подходов к регуляции количества мРНК, а следовательно, и белка в клетке является метод РНК-интерференции [8].

На сегодняшний день ряд препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов и малых интерферирующих РНК (siРНК) уже одобрен для применения в клинической практике при лечении наследственных метаболических заболеваний. Эти препараты характеризуются высоким терапевтическим индексом и эффективностью, а также пролонгированностью действия. Успехи применения терапевтических нуклеиновых кислот для лечения онкологических заболеваний пока более скромные, однако они активно используются для валидации новых мишеней [9, 10]. Синтетические siРНК представляют собой короткие РНК-дуплексы, способные активировать механизм РНК-интерференции. Антисмысловая цепь siРНК связывается с белком Ago2, образуя комплекс RISC, который в свою очередь взаимодействует с целевой мРНК, вызывая ее деградацию и ингибирование трансляции [11]. siРНК обладают высокой селективностью к мРНК-мишеням, что делает siРНК привлекательным инструментом для терапии [12]. Несмотря на развитие ряда инструментов для дизайна siРНК [13–16], создание активных siРНК остается сложной задачей.

В рамках данной работы нами были осуществлены дизайн, синтез и тестирование siРНК, подавляющих экспрессию гена ганкирина на уровне мРНК путем РНК-интерференции. На основании анализа вторичной структуры мРНК ганкирина были выбраны сайты связывания siРНК и проверена эффективность siРНК в линии гепатоцитов мыши AML12 *in vitro*. Для siРНК-кандидатов, показавших наибольшую активность *in vitro*, была подтверждена эффективность подавления экспрессии гена ганкирина *in vivo* в печени мышей линии BALB/C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка эффективности ингибирования мРНК ганкирина в клетках печени мышей. Для дизайна siРНК, подавляющих экспрессию мРНК ганкирина, нами был проведен анализ последовательности мРНК ганкирина мыши (NM_001164177.1, NM_016883.4 NCBI) с исключением возможных участков связывания эндогенных микроРНК, а

также последовательностей, встречающихся в других РНК транскриптома мыши. В результате анализа были выбраны семь siРНК, специфичных к мРНК ганкирина. Для увеличения их стабильности к действию внутриклеточных нуклеаз в процессе синтеза нами были использованы 2'-O-метильные пиримидиновые нуклеотиды и введены тиофосфатные группы между двумя последними нуклеотидами с 3'-конца. Все пиримидиновые нуклеотиды в составе смысловой цепи могут быть заменены, в то время как в антисмысловой цепи необходимо заменять пиримидиновые нуклеотиды только в составе динуклеотидов уридин(цитидин)-аденозин, т.к. при значительной или полной замене возможно снижение эффективности действия siРНК [17].

На следующем этапе мы сравнили эффективность подавления мРНК ганкирина под действием siРНК. Уровень экспрессии мРНК определяли через 24 ч после трансфекции siРНК в гепатоциты мыши AML12 методом ОТ-ПЦР. Степень ингибирования мРНК ганкирина составила $(80 \pm 7)\%$ для siРНК 1, 3 и 4, для siРНК 5 и 6 – около $(65 \pm 5)\%$, а для siРНК 2 и 7 – не более 40% относительно уровня мРНК в контрольных клетках (рис. 1). Для объяснения наблюдаемой разницы в эффективности ингибирования мы проанализировали расположение siРНК на процессированной форме мРНК ганкирина (NM_016883.4) (рис. 2а), а также вторичную структуру мРНК ганкирина в участках связывания siРНК (рис. 2б, 2в).

Следует отметить, что siРНК 2 и 7 комплементарны 3'-концу последнего экзона мРНК ганкирина, а также попадают в область с наибольшей структурной лабильностью. Видимо, именно возможность образования набора различных структур данной области мРНК ганкирина и определило низкую эффективность siРНК 2 и 7 (рис. 2в). siРНК, продемонстрировавшие среднюю эффективность, попали или на одноцепочечный участок в виде шпильки в структуре мРНК (siРНК 6) или на участок двойной спирали (siРНК 5) (рис. 2б). Возможно, полученные результаты обусловлены недоступностью таких участков из-за связывания с регуляторными белками. Наиболее эффективные siРНК (1, 3 и 4) комплементарны областям мРНК ганкирина, содержащим в своем составе как шпильчатый одноцепочечный участок, так и часть двойной спирали (рис. 2б). Полученные результаты важны для дизайна активных siРНК, однако необходимо учитывать, что релевантность результатов моделирования вторичной структуры РНК с реальной структурой в клетке ограничена [18].

Оценка эффективности ингибирования мРНК ганкирина в печени мыши. Мы отобрали две наиболее активные siРНК (3 и 4) для проверки их эффективности *in vivo*. Для этого siРНК были загружены в липидные наночастицы на основе липидоида

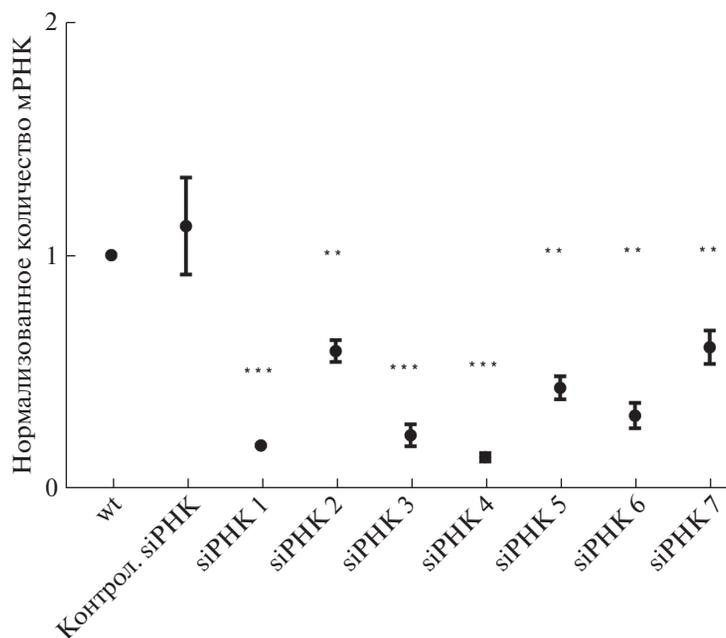


Рис. 1. Эффективность ингибирования мРНК ганкирина в гепатоцитах мыши AML12 под действием siРНК 1–7. Контроль, siРНК – siРНК к мРНК люциферазы светлячка; wt – контрольные клетки без обработки. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

С12-200 для адресной доставки в гепатоциты [19]. Мы определили эффективность ингибирования мРНК ганкирина *in vivo* после однократной инъекции частиц (дозы siРНК 0.05, 0.2, 0.5, 1 и 2 мг/кг). siРНК 3 и 4 показали высокую эффективность (подавление более 90%) *in vivo* уже при дозе 0.2 мг/кг (рис. 3). Важно отметить, что благодаря химической модификации siРНК даже при высоких дозах (1–2 мг/кг) не проявляли токсических эффектов и не активировали иммунную систему [10].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн и синтез siРНК. Дизайн siРНК к мРНК ганкирина (NM_001164177.1, NM_016883.4 NCBI) и контрольной siРНК к мРНК люциферазы свет-

лячка (XM_031473197.1) был проведен по методике, представленной в работе Leboeuf et al. [10]. siРНК (табл. 1) были синтезированы по амидофосфитной схеме (MerMade 12, BioAutomation, США), очищены методом ионообменной хроматографии, а их чистоту подтверждали методом ВЭЖХ-МС.

Клеточные линии. Гепатоциты мыши AML12 (ATCC, США) культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 5 мМ глутамин и 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37°C и 5% CO₂.

Трансфекция клеток AML12 siРНК. Клетки AML12 (~1 × 10⁵ клеток) трансфицировали siРНК в концентрации 10 нМ с помощью реагента Lipofectamine-RNAiMAX (Invitrogen, США) по прото-

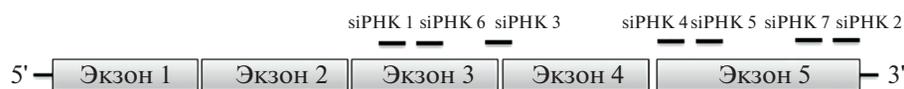
Таблица 1. Нуклеотидные последовательности siРНК

siРНК	Смысловая цепь	Антисмысловая цепь
siРНК 1	AcAuGuGAAuGcuGucAAuTsT	AUUGAcAGcAUUcAcAUGU TsT
siРНК 2	GGAGGAAGuuGuAuAuuuuTsT	AAAAuAuAcAACU UCCUCCTsT
siРНК 3	GcAuGAGAuGcuGuuAuG TsT	cAuAAcAGcAAUCUcAUGCTsT
siРНК 4	AcAcuAGccuGuGAuGAATsT	UUCaUcAcAGGCuAAGUGU TsT
siРНК 5	cucAAGGAGcAAGuAuuuATsT	uAAAuACUUGCUCUUGAG TsT
siРНК 6	ccGGGAuGAGAuGuAAAATsT	UUUuAcAAUCUcAUCCCGG TsT
siРНК 7	cAAcuAcAAGGuuAAuuuATsT	uAAAuAACCUUGuAGUUG TsT
Контрольная siРНК	cuUaCgCuGaGuAcUuCgATsT	UCgAaGuAcUcAgCgUaAgTsT

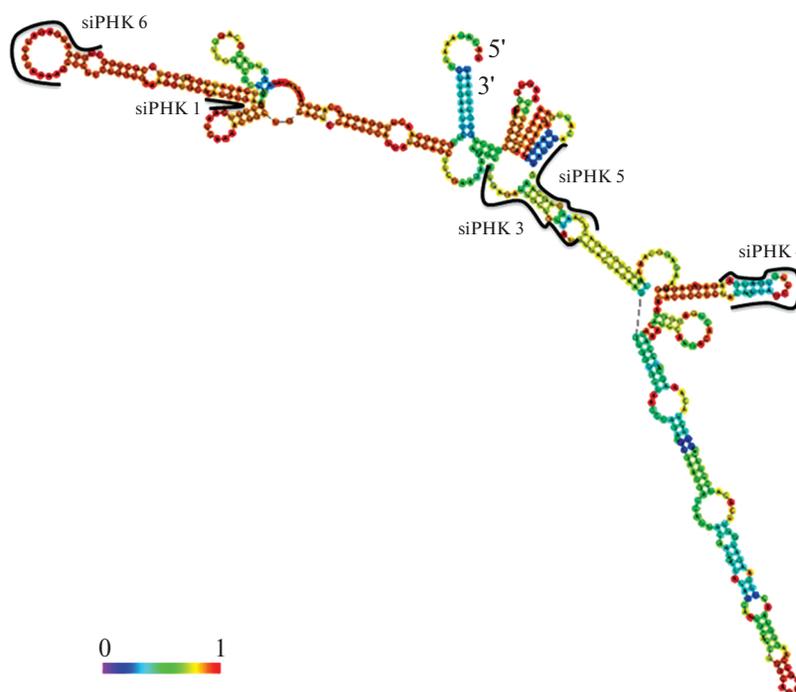
Примечание: заглавные буквы прямого начертания – рибонуклеотиды; заглавные курсивные буквы – дезоксирибонуклеотиды; строчные буквы – 2'-O-метилрибонуклеотиды; s – тиофосфат. Контрольная siРНК – siРНК к гену люциферазы светлячка.

(a)

мРНК ганкирина



(б)



(в)

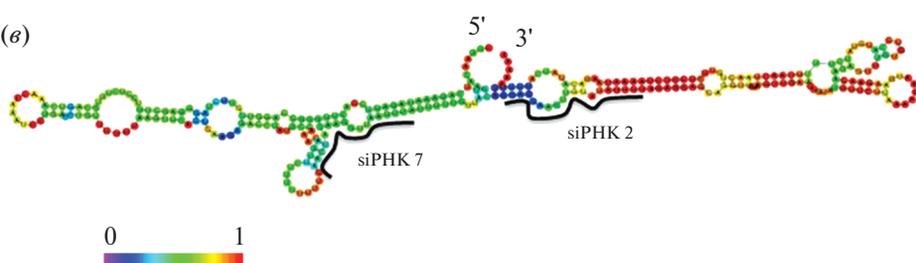


Рис. 2. (a) — Схема расположения синтезированных siRNA относительно экзонов мРНК ганкирина мыши; (б, в) — модель участков мРНК ганкирина мыши (NM_016883.4) с отмеченными местами связывания siRNA и обозначением вероятности образования/стабильности элементов вторичной структуры (цветная шкала): (б) — участок 200–700 нт, (в) — участок 1000–1300 нт мРНК ганкирина мыши.

колу производителя. В качестве контрольной siRNA использовали siRNA к гену люциферазы светлячка (табл. 1). Суммарную РНК выделяли через 24 ч после трансфекции, эффективность ингибирования анализировали методом ОТ-ПЦР.

Анализ транскрипции генов. Суммарную РНК из органов мыши или клеток AML12 выделяли с помощью реагента Trizol® (Invitrogen, США) по методике производителя. Далее ~1 мкг суммар-

ной РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific, США) по методике производителя для удаления остатков геномной ДНК и проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора реагентов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Реакционную смесь разбавляли в 3 раза водой и проводили реакцию амплификации в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) с использованием набора реа-

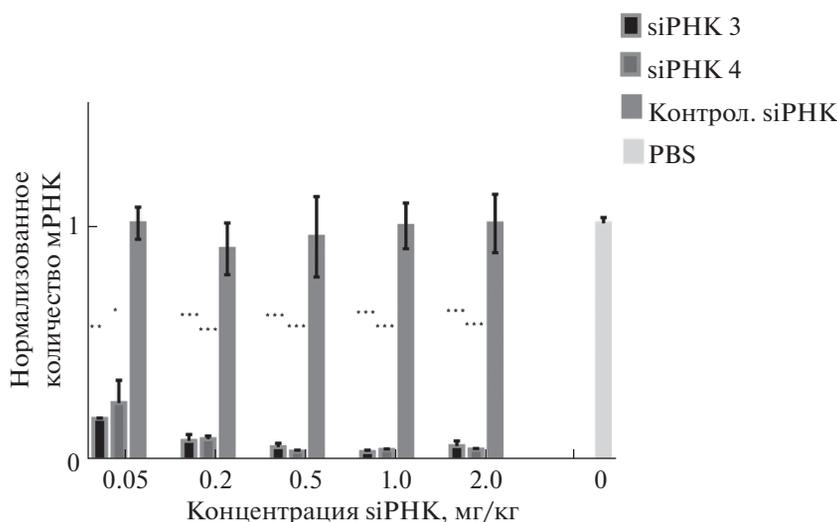


Рис. 3. Эффективность ингибирования мРНК ганкирина в гепатоцитах мышей линии BALB/C при инъекции липидных частиц с siRNA 3 и 4. Контроль. siRNA – siRNA к мРНК люциферазы светлячка; PBS – инъекция буфера PBS внутривенно (200 мкл). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

гентов PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, США) по методике производителя (0.3 мкМ смеси праймеров, 0.2 мкг кДНК). Для амплификации мРНК ганкирина использовали праймеры, последовательности которых представлены в табл. 2 (дизайн праймеров проведен в рамках данной работы); количество целевой РНК нормировали по мРНК Gapdh. Продукты реакции анализировали методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, pH 7.6).

Предсказание вторичной структуры мРНК ганкирина. Для определения возможной вторичной структуры мРНК ганкирина (NM_001164177.1, NM_016883.4 NCBI) использовали программу ViennaRNA (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>), которая позволяет предсказывать вторичные структуры РНК, обладающие минимальной свободной энергией, и учитывать вероятности образования пар оснований для РНК.

Таблица 2. Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
Gank-F	TTGAAGGAGCGCATTTTGGC
Gank-R	AGCGGAGGCAGCAATATGAA
Gapdh-F	TGCACCACCAACTGCTTAGC
Gapdh-R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Получение липидных частиц, содержащих siRNA.

Формулирование siRNA (табл. 1) в липидные наночастицы проводили путем смешивания водного раствора (10 мМ цитратный буфер, pH 3.0) 0.4 мг/мл siRNA со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже на приборе The NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems, США). Липидная смесь содержала следующие компоненты: ионизируемый липидоид C12-200, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids, США), холестерин (Sigma-Aldrich, США), C14-PEG-2000 (Avanti Polar Lipids, США) в молярном соотношении (%) 50 : 10 : 38.5 : 1.5. Количество липидов на единицу siRNA рассчитывали из массового соотношения siRNA к ионизируемому липидоиду C12-200 – 1 : 5. Для формирования частиц требуемого размера водную и спиртовую фазы смешивали в соотношении 3 : 1 по объему с общей скоростью смешивания 10 мл/мин. После смешения фаз полученную водно-спиртовую суспензию частиц диализовали в 500 объемах фосфатно-солевого буфера (pH 7.4, 12 ч, комнатная температура). После диализа частицы фильтровали в стерильных условиях через фильтр с мембраной из PES 0.22 мкм (Merck, США) и хранили при 4°C.

После фильтрации качество полученных частиц анализировали по двум параметрам: загрузка siRNA и размер частиц ($80-90 \pm 5$) нм (Zetasizer Nano ZSP, Malvern Panalytical, США). Концентрацию загруженной в липидные наночастицы siRNA определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific, США) суспензии частиц до их разрушения и после.

Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США).

Определение эффективности siРНК *in vivo*. Для оценки эффективности синтезированных siРНК *in vivo* мышам линии BALB/C (самки, $n = 48$, возраст 7–8 недель, 17–20 г, питомник “Столбовая”, Москва, Россия) внутривенно вводили липидные частицы, содержащие siРНК 3 и 4, либо частицы с контрольной siРНК, синтезированные по описанной выше методике.

До проведения эксперимента мышам взвешивали, рассчитывали необходимый для введения объем раствора siРНК, загруженной в липидные наночастицы. Препараты вводили в хвостовую вену в дозах siРНК 0.05, 0.2, 0.5, 1 и 2 мг/кг (три мыши в группе). В качестве дополнительной контрольной группы использовали животных, которым вводили 200 мкл раствора PBS внутривенно (три мыши в группе). Через 72 ч после введения животных наркотизировали с помощью 2%-ного изофлурана и извлекали печень. Кусочки печени (~30–50 мг) помещали в жидкий азот, после чего выделяли суммарную РНК реагентом Trizol® (Invitrogen, США) по методике производителя и анализировали уровень снижения мРНК ганкирина методом ОТ-ПЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы нами были проведены дизайн, синтез и валидация siРНК для подавления экспрессии ганкирина *in vitro* и *in vivo*. Согласно результатам моделирования вторичной структуры мРНК ганкирина мышам, наиболее эффективные siРНК комплементарны фрагментам мРНК, формирующим одновременно одно- и двухпочечные участки. Полученные siРНК могут быть использованы для изучения роли ганкирина в развитии ряда онкологических и метаболических заболеваний в моделях на животных.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-29-08046 – дизайн и синтез siРНК) и Российского научного фонда (грант 20-74-00116 – валидация siРНК *in vitro* и *in vivo*).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и одобрены этическим комитетом Института биологии развития человека (Москва, Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sergeeva O., Sviridov E., Zatsepin T. // *Semin. Liver Dis.* 2020. V. 40. P. 70–83. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693513>
2. Burenina O.Y., Lazarevich N.L., Kustova I.F., Shavochkina D.A., Moroz E.A., Kudashkin N.E., Patyutko Y.I., Metelin A.V., Kim E.F., Skvortsov D.A., Zatsepin T.S., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2020. in press. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03378-5>
3. Sun W., Ding J., Wu K., Ning B.-F., Wen W., Sun H.-Y., Han T., Huang L., Dong L.-W., Yang W., Deng X., Li Z., Wu M.-C., Feng G.-S., Xie W.-F., Wang H.-Y. // *Hepatology.* 2011. V. 54. P. 1259–1272. <https://doi.org/10.1002/hep.24530>
4. Liu Y., Higashitsuji H., Higashitsuji H., Itoh K., Sakurai T., Koike K., Hirota K., Fukumoto M., Fujita J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 432. P. 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.093>
5. Chattopadhyay A., O'Connor C.J., Zhang F., Galvagnion C., Galloway W.R.J.D., Tan Y.S., Stokes J.E., Rahman T., Verma C., Spring D.R., Itzhaki L.S. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 23732. <https://doi.org/10.1038/srep23732>
6. Thakur P., Hassan I. // *Int. J. Comput. Biol. Drug. Des.* 2011. V. 4. P. 373–386. <https://doi.org/10.1504/IJCBDD.2011.044404>
7. Zamani P., Riahi M.M., Momtazi-Borojeni A.A., Jami-alahmadi K. // *Artif. Cells.* 2018. V. 46. P. 1301–1313. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1388250>
8. Schuster S., Miesen P., Rij R. // *Viruses.* 2019. V. 11. P. 448. <https://doi.org/10.3390/v11050448>
9. Shi S., Wang L., Han D., Wu J., Jiao D., Zhang K., Chen J., Li Y., Yang F., Zhang J., Zheng G., Yang A., Zhao A., Qin W., Wen W. // *Theranostics.* 2019. V. 9. P. 1247–1263. <https://doi.org/10.7150/thno.29884>
10. Leboeuf D., Abakumova T., Prikazchikova T., Rhym L., Anderson D., Zatssepin T., Piatkov K. // *Mol. Ther.* 2020. V. 28. P. 1092–1104. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.021>
11. Sharp P. // *Genes & Develop.* 1999. V. 13. P. 139–141.
12. Schwarz D., Ding H., Kennington L., Moore J., Schelter J., Burchard J., Linsley P., Aronin N., Xu Z., Zamore P. // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. P. e140. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020140>
13. Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloon B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., Labow M., Reinhardt M., Natt F., Hall J. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 995–1001. <https://doi.org/10.1038/nbt1118>
14. He F., Han Y., Gong J., Song K., Wang H., Li Y. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 44836. <https://doi.org/10.1038/srep44836>
15. Ichihara M., Murakumo Y., Masuda A., Matsuura T., Asai N., Jijiwa M., Ishida M., Shinmi J., Yatsuya H.,

- Qiao S., Takahashi M., Ohno K.* // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. e123.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm699>
16. *Shabalina S., Spiridonov A., Ogurtsov A.* // *BMC Bioinformatics.* 2006. V. 7. P. 65.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-65>
17. *Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.* // *Cell.* 2003. V. 115. P. 29–216.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00801-8)
18. *Velema W., Kool E.* // *Nat. Rev. Chem.* 2020. V. 4. P. 22–37.
<https://doi.org/10.1038/s41570-019-0147-6>
19. *Love K., Mahon K., Levins C., Whitehead K., Querbes W., Dorkin J., Qin J., Cantley W., Qin L., Racie T., Frank-Kamenetsky M., Yip K., Alvarez R., Sah D., de Fougères A., Fitzgerald K., Kotliansky V., Akinc A., Langer R., Anderson D.* // *PNAS.* 2010. V. 107. P. 1864–1869.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0910603106>

Design and Validation of siRNA Targeting Gankyrin in the Murine Liver

T. A. Prikazchikova*, T. O. Abakumova*, O. V. Sergeeva*.,# , and T. S. Zatsepin*, **

Phone: +7 (926) 388-08-65; e-mail: o.sergeeva@skoltech.ru

*Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoy bulv. 30, str. 1, Moscow, 121205 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, str. 3, Moscow, 119991 Russia

Despite recent success in the treatment of hepatocellular carcinoma and other liver cancers, development of new therapeutic approaches remains an unmet medical need. Application of nucleic acids therapeutics allows prolong suppressing of undruggable targets. Nucleic acids therapeutics can be used either independently or in combination with small molecules and antibodies. Here we performed design, synthesis and validation of siRNAs targeting gankyrin mRNA *in vitro* and *in vivo*. As gankyrin upregulation in hepatocellular carcinoma causes increased hepatocytes proliferation, gankyrin is a promising therapeutic target. We have shown that the most effective miRNAs are complementary to mRNA fragments that form both single- and double-stranded regions as predicted by modeling of gankyrin mRNA secondary structure. The most efficient siRNAs were formulated in lipid nanoparticles and showed downregulation of gankyrin mRNA in the murine liver for more than 90% after a single injection 0.2 mg/kg. Selected siRNAs can be used to study the role of gankyrin in the development of liver cancer and metabolic diseases in murine models.

Keywords: small interfering RNAs, liver, gankyrin, RNA interference