MYC прото-онкогенийг дарангуйлах *siRNA*-ийг биоинформатикийн аргаар загварчилсан дүн

Б.Халиун[1], Б.Цэрэндолгор[3], Ц.Алтансүх[1,2]

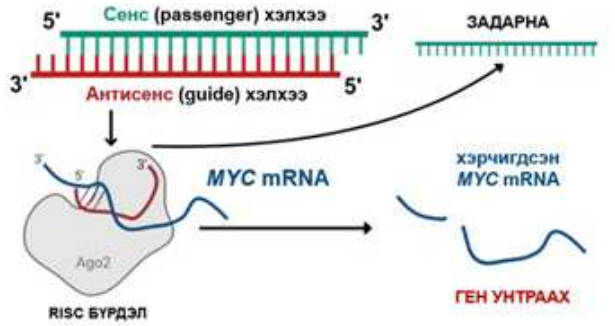
[1]АШУҮИС, Био анагаахын сургууль, Молекул биологи-Удамзүйн тэнхим
[2]АШУҮИС, Ахисан түвшний сургууль, Салбар дундын сургалтын төв
[3]Эм Зүйн Шинжлэх Ухааны Их сургууль, ЭЗУЗБТэнхим
Цахим шуудан: khaliun.bat@mnums.edu.mn, Утас: 99237517

Түлхүүр үг:
Элэгний эсийн хавдар
Биоинформатикийн хэрэглүүр
Антисенс
Онкоген
Транскриптийг дарангуйлах

Товч утга:
Үндэслэл: Судлаачдын сонирхлыг татаж буй нуклейн хүчилд суурилсан эм хэмээх молекулууд гений түвшинд шууд зохицуулалт хийх, интерференц РНХ-ийн (siRNAs) тусламжтай транскриптыг задалж дарангуйлах замаар олон өвчин, ялангуяа хорт хавдрыг эмчлэх эмнэлзүйн туршилтад РНХ-ийн эмчилгээ хурдацтай хөгжсөөр байна. Генетикийн шинжилгээгээр геномын олшруулалтаас (амплификаци) үүдэлтэй *MYC* прото-онкогений хэт их илрэл нь вируст болон архи хамааралт элэгний эсийн хавдрын 70%-д хүртэл тодорхойлогддог болохыг тогтоожээ. *MYC* прото-онкоген нь элэгний эсийн хавдрын үед *PI3K/Akt/mTOR, Wnt/β*-катенин, *MAPK/ERK* зэрэг дохио дамжуулах замуудад нөлөөлж хавдрын эсийн өсөлтөд шаардлагатай уураг нийлэгжлийг эрчимжүүлэх, транскрипцийг нэмэгдүүлэн хавдрын өсөлтийг өдөөж, дархлаанаас зайлсхийх чадвартай болгодог. *MYC* онкогенийг дарангуйлах тухай ойлголт улам бүр нэмэгдэж байна. **Зорилго:** *MYC* прото-онкогений идэвхжилийг дарангуйлах олон транскриптид өвөрмөц siRNA-ийг биоинформатикийн аргаар загварчлан, элэгний хавдрын эсэд үзүүлэх нөлөөллийг судлах. **Арга, аргачлал:** Туршилт судалгааны загварыг ашиглан *in silico* орчинд *MYC* прото-онкогений тодорхой уургийг кодолсон 15 транскрипт кандидатыг Ensembl-ээс татан авч эгнүүлэн нийт транскриптийн хамгийн их давтагдаж буй хэсгийг цааш siRNA таамаглахад ашигласан. Сонгогдсон CDS-ийн хувилбаруудыг siDirect 2.1 руу оруулан гурван кандидат хувилбарт цааш баталгаажуулалт (si-Explorer≥60, OligoWalk≥0.7, siPRED≥70%)-ын шинжилгээ хийв. siRNAs хос хэлхээний GC агууламж, siRNA бүрийн антисенс болон сенс хэлхээнд палиндромын дараалал байгаа эсэх, бай мРНХ-ын сайтад зөв холбогдох зэргийг урьдчилан таамаглаж уургийн орон зайн бүтцийг тодорхойллоо. **Үр дүн:** *MYC* прото-онкогений тодорхой уургийг кодолсон транскрипт кандидат бүрийг эгнүүлэн хамгийн их давтагдаж буй хэсгийг цааш siRNA таамаглахад ашиглахад боломжит гурван (s1, s2, s3) кандидат хувилбарыг цааш баталгаажуулан (s1 “siExplorer≥79.9, OligoWalk≥0.9, siPRED≥85.5%”, s2 “siExplorer≥64.2, OligoWalk≥0.87, siPRED≥91,9%”, s4 “siExplorer≥67.7, OligoWalk≥0.81, siPRED≥91.6%”) урьдчилан таамагласан. siRNA хэлхээ нь зөвлөмж бүхий GC агууламжтай, байнаас өөр хэсэгт холбогдох шинжгүй байлаа. Антисенс siRNA гуравдагч бүтцийг Ago2-ийн орон зайн бүтэцтэй өөрсдийн таамаглан загварчилсан siRNA антисенс хэлхээн дараалаар солин оруулж орон зайн бүтцийг загварчлахад siRNA нь Ago2-ийн PAZ–MID домэйн орчимд биологийн хувьд нийцтэй байрлалд, siRNA-Ago2 бүрдэл нь эцсийн бүтээгдэхүүн хэлбэртээ тогтвортой байсан. **Дүгнэлт:** Энэхүү судалгаанд элэгний эсийн хавдрын эсрэг, эмчилгээний боломжит олон трансприптэд өвөрмөц siRNA-ийг *MYC* прото-онкогений мРНХ-ийг дарангуйлах гурван siRNA-ийг амжилттай загварчиллаа. Сонгогдсон siRNA нь Ago2-тэй хүчтэй холбогдох боломжтойг харуулж байна. Цаашид *in vitro* болон *in vivo* туршилт судалгаагаар баталгаажуулах шаардлагатай.

Үндэслэл: РНХ-ийн интерференц (RNAi) сүүлийн үед түгээмэл арга болж, RNAi технологийг интерференцлэгч богино РНХ (сиРНХ/siRNA)-ээр транскриптыг задалж генийг дарангуйлагч болгоход ашигладаг.[1] Хүний төрөл бүрийн өвчин, ялангуяа хорт хавдрыг эмчлэх эмнэл зүйн туршилтуудад РНХ-ийн эмчилгээ хурдацтай хөгжсөөр байгаа бөгөөд олон генд өвөрмөц siRNA ашиглах нь элэгний эсийн хавдар зэрэг нарийн төвөгтэй өвчний генетик үйл ажиллагааг хянах сайн арга гэж судлаачид үзэж байна.[2] Сүүлийн жилүүдэд нуклейн хүчилд суурилсан эмүүд (NABD) гэж нэрлэгдсэн молекулууд судлаачдын сонирхлыг татаад байна. Эдгээр нь гений түвшинд шууд зохицуулалт хийх чадвартай учир хавдрын эсрэг эмчилгээний шинэ аргад нэвтэрч эхэлжээ. NABD-ийн дундаас siRNA нь эмчилгээний боломжит жижиг молекул гэж голчлон судлагдсан.[3]

siRNA нь ойролцоогоор 22 нуклеотидын урттай хоёр богино хэлхээтэй РНХ молекулууд юм. Эдгээр нь эсийн доторх (эндо) эсвэл эсийн гаднах (экзо) гаралтай байж болох бөгөөд сүүлийн үед вирус, транспозон зэргийн нуклейн хүчлүүдээс үүсгэх эсвэл судалгааны зорилгоор шинээр нийлэгжүүлэх зэрэг технологиуд нэвтрээд байна.[4] siRNA-ийг бүрдүүлдэг хоёр богино хэлхээний нэгийг нь антисенс хэлхээ гэх бөгөөд RISC (РНХ-ээр үүсгэгдсэн дарангуйлагч бүл) гэж нэрлэгдэх уургийн бүлтэй холбогдох, нөгөөх нь сенс хэлхээ гэгдэх ба RISC хамааралгүй үл хэрэглэгддэг. Антисенс хэлхээтэй RISC холбогдон идэвхжин бай РНХ-ийн дараалалтай комплементар холбоо үүсгэж нийлэгжлийг дарангуйлж улмаар генийн экспресс буурахад хүргэх байдлаар siRNA лабораторийн аргаар нийлэгжүүлэн өвчин үүсгэж буй гений мРНХ-ийг дарангуйлах боломжтой гэдгийг олон судлаачид тогтоосон байна.[5,6] (Зураг 1)



Зураг 1. siRNA үйлдлийн механизм.
siRNA-ийн сенс хэлхээ Ago2 уурагт холбогдоно, антисенс хэлхээ задарна. Ago2 нь бусад уургуудтай холбогдож RISC бүрдэл үүсгэн гений мРНХ дараалалд холбогдож эндонуклеазын идэвхжил нь мРНХ-г задалж, генийг унтраах.

Элэгний эсийн хавдар (ЭЭХ) нь элэгний анхдагч хорт хавдрын хамгийн түгээмэл хэлбэр бөгөөд дэлхий дахинд хорт хавдрын шалтгаант нас баралтын хоёрдугаарт эрэмбэлэгдэж байна. Түүний тархалт, эрсдэлт хүчин зүйлүүд харилцан адилгүй байдаг.[7] ДЭМБ-ын статистик мэдээллээр 2022 онд 19.9 сая гаруй хүн хорт хавдраар өвдөж, 9.7 сая хүн хорт хавдрын шалтгааны улмаас нас баржээ. Монгол улс дэлхийд нийт хорт хавдрын нас баралт тэр дундаа элэгний хорт хавдрын өвчлөл, нас баралтаараа тэргүүлж байна. Монгол улсын хүн амын дунд өвчлөлийн түвшин аль ч хүйсэд хамгийн өндөр бүртгэгдэж элэгний эсийн хавдрын эрсдэлт хүчин зүйлүүдэд архаг вируст гепатит (HBV ба HCV), архаг архины хэрэглээ, хүрээлэн буй орчны бохирдол, таргалалт, чихрийн шижин зэрэг багтана.[8,9] Хавдрын хяналтад байгаа хүмүүсийн 42.7% нь 5 ба түүнээс дээш жил амьдарч байна. Хэдийгээр мэс заслаар тайрах, элэг шилжүүлэн суулгах, хими эмчилгээ зэрэг нь элэгний эсийн хавдрын тавиланг уртасгаж өгдөг ч өвчний дахилт, үсэрхийлэл нь бүрэн эмчлэхэд бэрхшээлтэй хэвээр байна.[10]

Генетикийн шинжилгээгээр геномын олшруулалтаас (амплификаци) үүдэлтэй *MYC* прото-онкогений хэт их илрэл нь вируст болон архи хамааралт элэгний эсийн хавдрын 70 хүртэл хувьд тодорхойлогддог болохыг тогтоожээ.[11] *MYC* прото-онкоген нь элэгний эсийн хавдрын үед *PI3K/Akt/mTOR, Wnt/β*-катенин, *MAPK/ERK* зэрэг дохио дамжуулах замуудад нөлөөлж хавдрын эсийн өсөлтөд шаардлагатай уураг нийлэгжлийг эрчимжүүлэх, транскрипцийг нэмэгдүүлэн хавдрын өсөлтийг өдөөдөг. Мөн *MYC* гений идэвхжил нь хурдацтай өсөн нэмэгдэж буй хавдрын гликолиз, метаболизмыг нэмэгдүүлэх, судасжилтын факторыг дэмжин хүчилтөрөгч тэжээлээр хангах, дархлааны хариу урвалуудаас зайлсхийх зэрэгт оролцоно.[12] *MYC* онкоген нөлөөллийн талаарх ойлголт улам бүр нэмэгдэж, зорилтот бай эмчилгээний үр дүнтэй арга боловсруулах зайлшгүй шаардлагатай байна.

Өнөө үед тооцооллын биологи ба биоинформатик нь биологийн судалгааны чухал тулгуур болж, гений экспрессийг зохицуулдаг кодлогдоогүй РНХ-үүд (miRNA, siRNA, lncRNA)-ийг судлахад *in silico* хэрэглүүрүүдийг өргөн ашиглаж эхэлсэн. miRbase, siDirect 2.0, lncRNAdb зэрэг мэдээллийн сан, программ хангамжууд нь судлаачдад молекулын түвшний мэдээллийг хурдан, үр ашигтай шинжлэх боломж олгож, орчин үеийн био-анагаахын судалгаанд биоинформатикийн ач холбогдлыг тодорхой харуулж байна.[13]

Зорилго: *MYC* прото-онкогений идэвхжилийг дарангуйлах олон транскриптид өвөрмөц siRNA-ийг биоинформатикийн аргаар загварчлан, элэгний хавдрын эсэд үзүүлэх нөлөөллийг судлах.

Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын сургуулийн, Молекул биологи- Удамзүйн тэнхимийн сургалт судалгааны лабораторийг түшиглэн туршилт судалгааны *in silico* загварыг ашиглан хийж гүйцэтгэлээ. *MYC* прото-онкогений тодорхой уургийг кодолсон ДНХ-ийн дараалал (CDS)-ын нийт 15 транскрипт хувилбарыг Ensembl-ээс татан авч эгнүүлэн нийт транскриптийн хамгийн их давтагдаж буй хэсгийг цааш siRNA таамаглахад ашиглана. Сонгогдсон CDS-ийн хувилбаруудыг siDirect 2.1 ашиглан гений экспресст нөлөөлөхүйц боломжит siRNA-уудыг урьдчилан таамаглана. Ингэхдээ *Ui-Tei, Reynolds*, болон *Amarzguioui* алгоритмуудыг[14–16] үндэслэнэ (Хүснэгт 1). 2024 оны 7-р сарын байдлаар

Homo sapiens транскрипт Refseq хувилбарт хүний 225 транскриптийн мэдээллийн сан хуримтлагдсан нь siRNA-ийг сонгохдоо хамгийн сүүлийн үеийн мэдээлэлд тулгуурлаж байгаа юм.

Хүснэгт 1. siDirect 2.1-д ашигласан алгоритмууд.

Ui-Tei	*Reynolds*	*Amarzguioui*
1. Антисенс хэлхээний 5’ төгсгөлд A/U байх 2. Сенс хэлхээний 5’ төгсөлд G/C байх 3. Антисенс хэлхээний 5’ төгсгөлд A/U≥5 байх 4. GC суналт ≥9 нх байх	1. GC агууламж 30–52% байх 2. Сенс хэлхээний 15-19 дахь байрлалд A/U≥3 байх 3. Дотоод давталтгүй байх 4. Сенс хэлхээний 19 дахь байрлалд A байх 5. Сенс хэлхээний 3 дахь байрлалд A байх 6. Сенс хэлхээний 10 дахь байрлалд U байх 7. Сенс хэлхээний 19 дахь байрлалд G/C байхгүй 8. Сенс хэлхээний 13 дахь байрлалд G байхгүй	1. Хоёр хэлхээний төгсгөлийн 3 нуклеотид хооронд A/U агууламжтай байх 2. Сенс хэлхээний 1 дэх байрлалд U байхгүй 3. Сенс хэлхээний 6 дахь байрлалд A байх 4. Сенс хэлхээний 5’ төгсгөл хүчтэй холбогдолт 5. Сенс хэлхээний 3’ төгсгөл сул холбогдолт 6. Сенс хэлхээний 19 дахь байрлалд G байхгүй 7. Сенс хэлхээний 1 дэх байрлалд G/C байх 8. Сенс хэлхээний 1 дэх байрлалд A/U байх

Тайлбар: *Боломжит siRNAs урьдчилан таамаглахын тулд дараалал нь бүх дөрвөн Ui-Tei дүрэм эсвэл дор хаяж зургаан Reynolds дүрэм, эсвэл дор хаяж гурван Amarzguioui дүрмийг хангасан байх ёстой.*

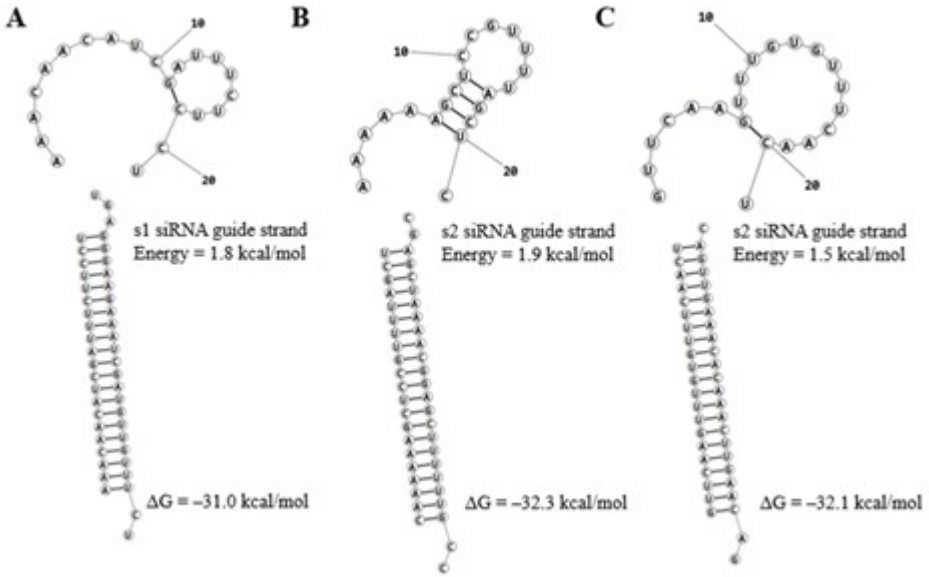
Урьдчилан таамагласан siRNA-ийг siExplorer, OligoWalk, siPRED серверүүдийг ашиглан баталгаажуулалт хийв. siExplorer≥60, OligoWalk≥0.7, siPRED≥70% оноо авсан *siRNAs* цаашдын шинжилгээнд оруулав. siRNAs хос хэлхээний GC агууламж, siRNA бүрийн антисенс болон сенс (guide and passenger) хэлхээнд палиндромын дараалал байгаа эсэхийг OligoCalc, siRNA антисенс хэлхээ бүр бай мРНХ-ын сайтад очиж холбогдох боломжийг Mfold программын siRNA module зэргийг ашиглан урьдчилан таамагласан. Антисенс siRNA гуравдагч бүтцийг BIOVIA Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298, Hdock ашиглан Ago2-ийн орон зайн бүтэц (3D)-тэй өөрсдийн таамаглан загварчилсан siRNA антисенс хэлхээн бүрдлийн орон зайн бүтцийн загвар гаргалаа.

Үр дүн: Нийт *MYC* гений 15 транскриптийн CDS-ийг Ensembl-ээс авч эгнүүлэн нийт транскриптийн хамгийн их давтагдаж буй хэсгийг цааш siRNA таамаглахад ашиглахад 6 зорилтот байршилд холбогдох кандидат тодорхойлогдсон ба siDirect 2.1. хэрэглүүрийн алгоритмд үндэслэн бүх шалгуурыг хангасан 827-852 дахь хос суурьтай холбогдох “s1”, 1156-1179 дахь хос суурьтай холбогдох “s2”, 1328-1350 дахь хос суурьтай холбогдох “s4” дээрх 3 кандидатыг сонгон авсан (Хүснэгт 2). Seed хосолсон бүсийн хайлах температур (Tm)-ийн хувьд s1 болон s4-ийн антисенс гинжний Tm харьцангуй өндөр байгаа нь зорилтот мРНХ-тэй илүү тогтвортой танигдан холбогдох магадлалтайг илтгэнэ. Харин s2-ийн Tm бага байгаа нь холболтын тогтвортой байдал харьцангуй сул байж болзошгүй таамаглаж байна. Сонгон авсан гурван антисенс хэлхээнд нэмэлт биоинформатикийн siExplorer (s1≥79.9, s2≥64.2, s4≥67.7), OligoWalk (s1≥0.9, s2≥0.87, s4≥0.81), siPRED (s1≥85.5%, s2≥91,9%, s4 ≥91.6%) хэрэглүүрүүд ашиглан GC агууламж, палиндром бүтэц, off-target нөлөөг шалгахад GC агууламж 36.8% тогтвортой бүтэцтэй, өөртэйгөө эвхэгдэн hairpin үүсгэх палиндром дараалалгүй, ямар нэгэн off-target нөлөөгүй болох нь тодорхойлогдсон.

Хүснэгт 2. *MYC* онкоген өвөрмөц siRNA үндсэн шинж чанарын үнэлгээ

***MYC* генийн CDS дахь зорилтот байршил**	**№**	**Антисенс (guide) хэлхээ**	**Seed хосолсон бүсийн Tm (guide, °C)**	**Seed хосолсон бүсийн Tm (passenger, °C)**	**GC агууламж (%)**
827-852	s1	AAACAACAUC-GAUUUCUUCCU	19.3	14.8	36.8
1156-1179	s2	AAAAAAGCUC-CGUUUUAGCUC	12.3	13.7	36.8
1328-1350	s4	GUUCAAGUUUGU-GUUUCAACA	19.2	14.9	36.8

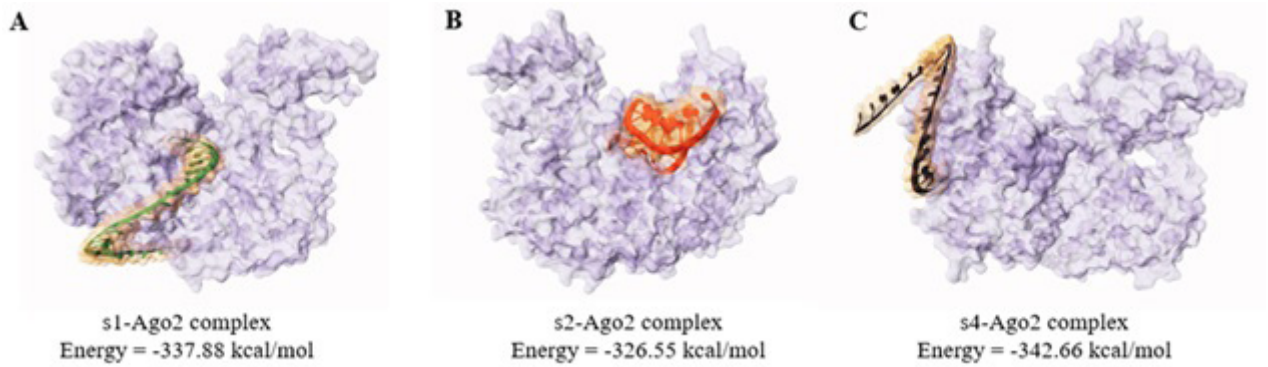
Урьдчилан таамагласан siRNA болон мРНХ-siRNA дуплексийн хоёрдогч бүтцийг MaxExpect программ ашиглан загварчлав (Зураг 2). Дан антисенс хэлхээ байдалдаа s1 болон s4 бүтцэд ≥4 нуклеотид урт палиндром дараалал илрээгүй бөгөөд hairpin хэлбэрийн гогцоо үүсээгүй нь өмнөх OligoCalc шинжилгээний үр дүнг баталгаажуулав. Нугалагдах чөлөөт энерги (ΔG) 1.5–1.9 ккал/мол-ийн хооронд байгаа нь антисенс гинж өөрөө тогтвортой хоёрдогч бүтэц үүсгэх хандлага багатайг харуулж байна. мРНХ–siRNA дуплекс бүтэц үүсгэхдээ зорилтот дараалалтай бүрэн комплементар холбогдож, холболтын чөлөөт энерги −31.0-ээс −32.3 ккал/мол-ийн хооронд байгаа нь өндөр тогтвортой холбоо үүсэх боломжтойг илтгэнэ.



Зураг 2. Урьдчилан таамагласан siRNA-ийн хоёрдогч бүтэц.
A. s1 B. s2, C. s4

Цаашид бид siRNA болон Ago2 уургийн харилцан үйлчлэлийг молекул загварчлалын аргаар орон зайн бүтцэд үнэлэв. Урьдчилан таамагласан siRNA-ийн гурван өөр дараалал (s1, s2, s4)-ыг Ago2 уурагтай холболт (docking) хийж, үүссэн комплекс бүрийн орон зайн зохион байгуулалт болон холболтын энергийг тооцоолсон (Зураг 3).

Үр дүнгээс харахад бүх siRNA-үүд Ago2 уурагтай амжилттай холбоо үүсгэн байрласан ба Ago2–siRNA комплекс үүсэх боломжтой болохыг харууллаа. s1-Ago2 комплексийн холбооны энерги (−337.88 ккал/мол) уургийн идэвхтэй хэсэгт тогтвортой байрлаж, уургийн гадаргуутай олон цэгийн харилцан үйлчлэл үүсгэж байна (Зураг 4A). s2-siRNA-ийн хувьд холболтын энерги (−326.55 ккал/мол) бусад хоёр загвартай харьцуулахад харьцангуй сул харилцан үйлчлэлтэй байгааг илтгэнэ (Зураг 4B). Харин s4 siRNA-ийн холболтын үр дүнд хамгийн бага сөрөг утгатай холболтын энерги (−342.66 ккал/мол) ажиглагдсан бөгөөд энэ нь ашигласан холболтын алгоритмын хүрээнд Ago2 уурагтай хамгийн тогтвортой комплекс үүсгэж байгааг харуулж байна (Зураг 4C).



Зураг 3. Уураг болон siRNA-ийн харилцан үйлчлэлийн орон зайн бүтцийн молекул загварчлал.
A. s1, B. s2, C. s4

Хэлцэмж: ДНХ, РНХ, уурагт суурилсан молекул биологийн уламжлалт туршилт судалгаанууд нь ихээхэн өндөр өртөг, урт хугацаа шаарддаг бол орчин үеийн хиймэл оюун ухаан болон биоинформатикийн онлайн хэрэглүүрүүд ашигласнаар микро молекулын түвшний судалгааг лабораторийн нарийн процессоос өмнө илүү хурдан, өндөр нарийвчлалтай, баталгаатайгаар урьдчилан үнэлэх боломж бүрджээ.[17] 2012 онд *Yuki* нарын Япон судлаачид тодорхой зорилтот генээс өөр генд ямар ч нөлөө үзүүлдэггүй siRNA ашиглах, түүний механизмд үндэслэн загварчлах арга болон нийтэд нээлттэй вэб хэрэглүүрийг танилцуулсан.[18] Энэхүү судалгаагаараа *MYC* прото-онкогений бүх транскрипт хувилбарт их давтагдсан хэсгийг ашиглан биоинформатикийн аргаар урьдчилан таамагласан siRNA-ийг сонгон авч, Ago2 уургийн бүрдэл, RISC үүсэлттэй холбоотой *in silico* үнэлгээг хийж гүйцэтгэлээ. RNAi механизм нь siRNA-ийн антисенс хэлхээ Ago2 уургийн бүлтэй холбогдон**,** PIWI домэйнээр зорилтот мРНХ-ийг комплементар холбоо үүсгэн задалж дарангуйлдаг болох нь тогтоогдсон.[19]

2024 онд *Lauren* нарын *CTNNB1* гений мРНХ өвөрмөц siRNA загварчилсан судалгаагаар олон транскриптид өвөрмөц дөрвөн siRNA загварчилсан бөгөөд GC агууламж 33-35%, ≥4 нуклеотид агуулах палиндром дараалалгүй, off-target нөлөөгүй тодорхойлогдсон.[20] Энэ нь бидний урьдчилан таамагласан s1, s2, s4 siRNAs өндөр Tm-тай seed

region болон hairpin үүсгэхгүй өндөр тогтвортой хоёрдогч бүтэцтэй, RISC төлөөлөх Ago2 уурагтай сайн тохирох боломжтой гэсэн таамаглалд нийцэж байна. Дээрх аргачлал нь цаашид хамгийн оновчтой siRNA кандидатыг сонгон *in vitro* болон *in vivo* туршилт явуулах суурь судалгаа болно. Цаашид эдгээр siRNA-ийг *in vitro* болон *in vivo* нөхцөлд туршиж баталгаажуулснаар *MYC* прото-онкогенийг дарангуйлах чадварыг үнэлэх бүрэн боломжтой.

Дүгнэлт: Энэхүү судалгаанд элэгний эсийн хавдрын эсрэг, эмчилгээний боломжит олон трансприптид өвөрмөц siRNA-ийг *MYC* прото-онкогений мРНХ-ийг дарангуйлах гурван siRNA-ийг амжилттай загварчиллаа. Сонгогдсон siRNA нь Ago2-тэй хүчтэй холбогдох боломжтойг харуулж байна. Цаашид *in vitro* болон *in vivo* туршилт судалгаагаар баталгаажуулах шаардлагатай.

Ном зүй:

1. *Li, T. et al. Multi-target siRNA: Therapeutic Strategy for Hepatocellular Carcinoma. J. Cancer 7, 1317–1327 (2016).*
2. *Tabernero, J. et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. Cancer Discov. 3, 406–17 (2013).*
3. *Agostini, F. et al. Potential applications of small interferring RNA in the cardiovascular field. Drugs Future 31, 0513 (2006).*
4. *Scaggiante, B. et al. Improving siRNA Bio-Distribution and Minimizing Side Effects. Curr. Drug Metab. 12, 11–23 (2011).*
5. *Farra, R. et al. Polymer-Mediated Delivery of siRNAs to Hepatocellular Carcinoma: Variables Affecting Specificity and Effectiveness. Molecules 23, 777 (2018).*
6. *Habib, S., Ariatti, M. & Singh, M. Anti-c-myc RNAi-Based Onconanotherapeutics. Biomedicines 8, 612 (2020).*
7. *Kim, D. Y. Changing etiology and epidemiology of hepatocellular carcinoma: Asia and worldwide. Journal of Liver Cancer 24, 622–70 (2024).*
8. *Liu, K.-Y., Wang, L.-T., Hsu, S.-H. & Wang, S.-N. Homeobox Genes and Hepatocellular Carcinoma. Cancers (Basel). 11, (2019).*
10. *Herrero, A. et al. Management of hepatocellular carcinoma recurrence after liver surgery and thermal ablations: state of the art and future perspectives. Hepatobiliary Surg. Nutr. 13, 71–88 (2024).*
11. *Min, Z. et al. The Clinicopathologic and Prognostic Significance of c-Myc Expression in Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis. Frontiers in Bioinformatics 1, (2021).*
12. *Dai, P. & Wang, L. Targeting c-MYC has a key role in hepatocellular carcinoma therapy. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 213, 104786 (2025).*
13. *Chakraborty, C., Bhattacharya, M. & Ranjan Sharma, A. miRNA, siRNA, and lncRNA: Recent Development of Bioinformatics Tools and Databases in Support of Combating Different Diseases. Curr. Bioinform. 19, 39–60 (2024).*
14. *Ui-Tei, K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. Nucleic Acids Res. 32, 936–948 (2004).*
15. *Reynolds, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. Nat. Biotechnol. 22, 326–330 (2004).*
16. *Amarzguioui, M. & Prydz, H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 1050–1058 (2004).*
17. *Jumper, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596, 583–589 (2021).*
18. *Naito, Y. & Ui-Tei, K. siRNA Design Software for a Target Gene-Specific RNA Interference. Front. Genet. 3, 102 (2012).*
19. *Feng, X. & Guang, S. Functions and applications of RNA interference and small regulatory RNAs. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 57, 119–130 (2024).*
20. *Fajardo, L. E., Macalalad, M. A., Odchimar, N. M., de Guzman, J. C. & Orosco, F. Computational design and validation of siRNA molecules to silence oncogenic CTNNB1 mRNA as a potential therapeutic strategy against hepatitis B/C virus-associated hepatocellular carcinoma. Pharmacia 71, 1–14 (2024).*

Bioinformatic Design and Computational Validation of siRNA Targeting the *MYC* Proto-Oncogene

Khaliun B[1], Tserendolgor B[3], Altansukh Ts[1,2]

[1]Department of Molecular Biology and Genetics, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Center of Interdisciplinary Education, Graduate School of Medical Science, MNUMS
[3]Mongolian University of Pharmaceutical Sciences
E-mail: khaliun.bat@mnums.edu.mn, Tel: +976-99237517

Abstract:
Background: RNA-based therapeutics are rapidly advancing in clinical trials for the treatment of various diseases, particularly cancer, through the use of nucleic acid–based drugs that directly regulate gene expression at the molecular level and suppress transcription by degrading target RNA via small interfering RNAs (siRNAs). Genetic studies have shown that overexpression of the *MYC* proto-oncogene, caused by genomic amplification, is observed in up to 70% of hepatocellular carcinoma cases associated with viral infections and alcohol-related liver disease. The *MYC* proto-oncogene influences key signaling pathways such as *PI3K/Akt/mTOR, Wnt/β-catenin*, and *MAPK/ERK* in hepatocellular carcinoma, thereby enhancing protein synthesis required for tumor cell growth, increasing transcriptional activity, promoting tumor progression, and enabling immune evasion. Consequently, the concept of inhibiting the *MYC* oncogene has gained increasing attention.
Aim: To design multi-transcript–specific siRNAs targeting the *MYC* proto-oncogene using bioinformatics approaches and to investigate their effects on hepatocellular carcinoma cells.
Materials and Methods: Using an in silico experimental design, 15 transcript candidates encoding a specific protein of the *MYC* proto-oncogene were retrieved from *Ensembl* and aligned to identify the most conserved regions across all transcripts, which were then used for subsequent siRNA prediction. Selected coding sequence (CDS) variants were analyzed using siDirect 2.1, and three candidate variants were further validated based on the following criteria: siExplorer ≥ 60, OligoWalk ≥ 0.7, and siPRED ≥ 70%. The GC content of the siRNA duplexes, the presence of palindromic sequences in both antisense and sense strands, and the specificity of binding to the target mRNA sites were predicted. Additionally, the three-dimensional structure of the protein was modeled.
Results: By aligning transcript candidates encoding a specific protein of the *MYC* proto-oncogene and identifying the most conserved regions, three potential candidate variants (s1, s2, s3) were predicted and further validated: s1 (siExplorer ≥ 79.9, OligoWalk ≥ 0.9, siPRED ≥ 85.5%), s2 (siExplorer ≥ 64.2, OligoWalk ≥ 0.87, siPRED ≥ 91.9%), s3 (siExplorer ≥ 67.7, OligoWalk ≥ 0.81, siPRED ≥ 91.6%). The siRNA sequences exhibited recommended GC content and showed no off-target binding. When modeling the three-dimensional structure by incorporating the predicted antisense siRNA strand into the spatial structure of Ago2, the siRNA was positioned in a biologically compatible manner within the PAZ–MID domain region, and the siRNA–Ago2 complex remained stable in its final conformation.
Conclusion: In this study, three multi-transcript–specific siRNAs targeting *MYC* proto-oncogene mRNA were successfully designed as potential therapeutic candidates against hepatocellular carcinoma. The selected siRNAs demonstrated strong binding affinity to Ago2. Further validation through *in vitro* and *in vivo* studies is required.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, Bioinformatics tools, Antisense, Oncogene, Transcriptional repression