

**БИВАЛЕНТНЫЕ ДНК-УСТРОЙСТВА
ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНЫХ РНК****Дубовиченко М.В.** (Лаборатория SCAMT,
Национальный исследовательский университет ИТМО)**Научный руководитель – к.х.н., Колпащиков Д.М.**
(Лаборатория SCAMT, Национальный исследовательский университет ИТМО)

Аннотация. Мы разработали бивалентные ДНК-устройства на основе ДНКзимов, ингибирующие мРНК-мишени эффективнее, чем одиночные ДНКзимы. Повышение эффективности обусловлено наличием двух ДНКзимов, ассоциированных в одном ДНК-устройстве. Исследованные ДНК-устройства предполагаются как альтернатива современным генотерапевтическим олигонуклеотидам: малые интерферирующие РНК, ДНКзимы и антисмысловые олигонуклеотиды.

Введение. Терапевтические олигонуклеотиды (ТОН) являются классом перспективных лекарств, включающих в себя малые интерферирующие РНК, ДНКзимы и антисмысловые олигонуклеотиды. Они способны лечить такие заболевания, как рак, вирусные и бактериальные инфекции и наследственные заболевания на молекулярно-генетическом уровне путем ингибирования мРНК. Одним из существенных недостатков ТОН является потеря их эффективного действия при взаимодействии со сложной структурой мРНК. Из-за этой проблемы только 10% введенных ТОН взаимодействуют с мишенью мРНК (Zhou W., et al. *Theranostic DNAzymes // Theranostics // 2017. № 4 (7). 1010–1025.*). Повышение эффективности ассоциации ТОНов со сложными мишенями РНК позволит снизить терапевтически эффективные концентрации ТОНов и тем самым уменьшить побочные эффекты, вызванные высокой концентрацией вводимых препаратов. Один из способов решения этой проблемы предложил Суд его группа (Sood V. et al. *DNA-enzyme-mediated cleavage of human immunodeficiency virus type 1 Gag RNA is significantly augmented by antisense-DNA molecules targeted to hybridize close to the cleavage site // Oligonucleotides. 2007. № 1 (17). С. 113–121.*), где двухкомпонентный ДНК-препарат, состоящий из антисмыслового олигонуклеотида и ДНКзима вместе, эффективно ингибировал мРНК вируса иммунодефицита человека в сложных участках. В нашей работе мы также предлагаем использовать два ТОНа на основе ДНКзимов, которые кооперативно ассоциируются с мРНК-мишенью и расщепляют её в двух местах. ДНКзимы представляют собой одноцепочечные молекулы ДНК, которые комплементарно распознают и каталитически расщепляют мишень мРНК. ДНКзимы состоят из доменов (рук), связывающихся с мРНК-мишенью и каталитическое ядро, запускающее расщепление мРНК.

Основная часть. Мы разработали три бивалентных ДНК-устройства (BiDV), каждое из которых состояло из двух РНК-деградирующих субъединиц на основе ДНКзимов (Dz1 и Dz2), но отличалось в способе ассоциации между собой ДНКзим-содержащих субъединиц T1 и T2: EDM-38, HDM-75, HEG-Dzs. Субъединицы EDM-38 комплементарно соединены хвостовыми участками на 5' и 3' концах, в то время как у HDM-75 соединение идет на 3' и 3' концах. У HEG-Dz обе субъединицы соединены вместе гексаэтиленгликольным линкером (HEG) на 5' и 3' концах, как у EDM-38. В качестве мишени расщепления мы использовали мРНК-фрагмент гена домашнего хозяйства EIF3C (РНК-60), чрезмерно экспрессированный в клетках рака толстой кишки. Этот ген кодирует субъединицу EIF3C, участвующую в трансляции мРНК. Ингибирование этого гена приводит к остановке пролиферации с последующей гибелью клеток.

Мы сравнили каталитическую эффективность BiDVs с обычным ДНКзимом (Dz1). В однооборотных (single-turnover) условиях (2 мкМ агента расщепления, 1 мкМ РНК-60 мишени при 5 и 15 минутах) EDM-38 и HEG-Dzs показали увеличение расщепления на 82% и 92% по сравнению с Dz1. Улучшение расщепления было продемонстрировано из-за «плотного»

В условиях многократного оборота (multiple-turnover; 10 нМ агентов расщепления инкубировались с 1 мкМ РНК-60 при 1, 3, 7 и 24 часах) HDM-75 показал увеличение расщепления на 65% по сравнению с Dz1 за счет более свободного связывания субъединиц T1 и T2 на 3' и 3' концах. В это же время из-за замедленной диссоциации от продуктов расщепления EDM-38 и HEG-Dzs показали 10%-ую потерю скорости расщепления по сравнению с Dz1.

Выводы. Результаты подтверждают возможность повышения эффективности расщепления РНК-мишеней с помощью бивалентных ДНК-устройств (BiDV). Гипотеза требует дальнейшего подтверждения с использованием РНК-мишени с более сложными вторичными структурами, чем у исследуемой модели РНК-60. Также в будущем планируется использование РНК-расщепляющих субъединиц на основе антисмысловых олигонуклеотидов.

Дубовиченко М.В. (автор)

Подпись

Колпащиков Д.М. (научный руководитель)

Подпись