

РАЗРАБОТКА ДНК-НАНОМАШИНЫ НА ОСНОВЕ АНТИСМЫСЛОВОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА ДЛЯ МАРКЕР-АКТИВИРУЕМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Недорезова Д.Д. (Университет ИТМО)

Научный руководитель – к.х.н., профессор Колпащиков Д.М. (Университет ИТМО)

Аннотация: В данной работе представлена разработка ДНК-наномашин на основе антисмыслового олигонуклеотида, способной регулировать экспрессию целевого гена только в присутствии маркерной последовательности. Описанная ДНК-наноконструкция в перспективе может решить проблемы токсичности известных олигонуклеотидных подходов и стать фундаментальной основой для создания нового способа генной терапии рака.

Наиболее известным подходом к регуляции экспрессии генов является использование антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), синтетических одноцепочечных молекул ДНК длиной 15-30 нуклеотидов (нт) полностью комплементарных последовательностям целевых РНК. При комплементарном связывании АСО и целевой РНК запускается несколько механизмов подавления экспрессии соответствующего гена. Одним из основных является ферментативное расщепление РНК, находящейся в дуплексе с АСО, при помощи внутриклеточной рибонуклеазы H2 (РНКаза H), при этом АСО высвобождается и связывается с другой целевой РНК. Такая активность АСО позволяет эффективно снижать экспрессию заданного гена, что активно применяется в терапии рака. Так, в клинических испытаниях приняло участие одиннадцать АСО, нацеленных на гены, вовлечённые в онкогенную трансформацию клеток и устойчивость к химиотерапии. Ряд испытаний выявили высокую токсичность терапевтических агентов, которая могла быть вызвана подавлением целевых транскриптов не только в раковых, но и в здоровых клетках. ДНК-наномашин на основе АСО, активируемая только в присутствии раковых маркеров, способна решить проблему низкой специфичности. Таким образом, целью данной работы является разработка ДНК-конструкции на основе АСО для маркер-активируемой регуляции экспрессии генов.

Для достижения поставленной цели исходный АСО был разделен на две части АСО-а и АСО-б, каждая из которых состояла из двух участков ДНК: комплементарной целевой РНК и комплементарной раковому маркеру – соединенных между собой гексаэтиленгликолевым линкером. АСО-а и АСО-б были включены в ДНК каркас, удерживающий обе части рядом. В присутствии маркера рака – мутированного фрагмента гена KRAS, АСО-а и АСО-б объединялись в комплекс, способный связывать и вызывать РНКаза H-зависимое расщепление РНК мишени. В ходе экспериментов по расщеплению целевой синтетической РНК в присутствии рекомбинантной РНКаза H было показано, что такая ДНК-конструкция обладает низкой зависимостью от наличия ракового маркера в растворе, поскольку обе части АСО частично связывались с целевой РНК и активировали РНКаза H-зависимое расщепление. Для уменьшения активности ДНК машины в отсутствие маркера рака к ДНК каркасу были добавлены дополнительные участки ДНК, удерживающие РНК-комплементарные участки АСО от присоединения к РНК мишени в отсутствие раковой маркерной последовательности.

Таким образом, была разработана ДНК-наномашин на основе АСО, способная активировать РНКаза H-зависимое расщепление в присутствии ракового маркера с эффективностью, равной исходному АСО, и в два раза превосходящей активацию в отсутствие маркера. В будущем планируется произвести выбор химических модификаций ДНК-наномашин для повышения устойчивости конструкции к внутриклеточным нуклеазам и испытать эффективность и селективность разработанной ДНК-конструкции на культуре клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90071.