

Соединение нескольких ДНК-цепей в функциональное наноустройство с использованием «клик» химии.

Каренко А.С. (Университет ИТМО, SCAMT)

Научный руководитель – кандидат химических наук, Колпащиков Д.М.

Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург. Россия

Аннотация

Разработка методов лечения сложных заболеваний в основном требует комбинированных подходов терапии. В настоящее время разработаны разные конструкции ДНК-ферментов, применяющиеся против одного или нескольких генов. В настоящем исследовании, собран обзор эффективного применения и сборки дезоксирибозима модифицированного с помощью реакции клик-химии, нацеленного на цель прототип матричной РНК, которая затем подвергается расщеплению *ин витро*.

Введение.

ДНК-ферменты показали потенциал в качестве терапевтических средств при различных заболеваниях. Оказывая различные типы влияния: противовирусное, антибактериальное, противораковое и противовоспалительное. В раннем исследовании Готд и его коллеги разработали метод обнаружения ДНК в реальном времени с использованием процедуры под названием DzyNA-PCR, которая позволила обнаружить 10 копий мишени [1]. Еще одним конкурентным способом обнаружения молекул является использование аптамеров с ДНК-энзимами, позволяя получить высокоспецифичные показатели [2].

Первостепенной задачей тераностики сегодня, является, создание ДНК ферментов разработанных для одновременного глушения и детектирования мРНК. Наша цель -создание ДНК-фермента для тераностики на основе модульной технологии «клик»-химии.

Основная часть.

В последнее время применяются подходы по комбинированию нескольких ДНК-ферментов или других нуклеиновых агентов глушения генов (примеры) с несколько степенной «валентностью» либо стехиометрией к целевой молекуле. Важным ограничением рибозима, использования его в культуре клеток или *ин vivo* является восприимчивость к нуклеотической деградации и необходимости правильной доставки в подходящие мишени. РНК-основа рибозима делает их восприимчивыми к РНК-расщеплениям (наверное поэтому, основываясь на главном преимуществе и отличии дезоксирибозимов, невосприимчивых к нуклеазам, они все еще не были обнаружены в природе и, вероятно, не будут).

Для преодоления всех вышеперечисленных сложностей при использовании РНК-зимов, были созданы ДНК-зимы на основе ДНК.

В настоящее время многие из них претерпевают дальнейшую рациональную эволюцию дизайна и улучшения, в зависимости от контекста. Связанные триазольным кольцом олигонуклеотиды обладают повышенной устойчивостью к расщеплению обусловленному эндо- и экзонуклеазами, что улучшает биодоступность конструкции в физиологических условиях (Efthymiou et al., 2012). Клик-химические модификации могут оказаться следующим безопасным убежищем с точки зрения создания пригодных для использования форм лекарств по типам и организмам, в которых нативные фосфодиэфирные

связи заменены триазолами (El-Sagheer, 2012). Наше основное внимание уделяется мембранам и физиологическим жидкостям млекопитающих. После тестирования первоначального раунда модифицированных дезоксирибозимов и антисмысловых олигонуклеотидов теперь мы создаем биосовместимую химическую связь, подходящую для наших целей, нацеленную на интересующие гены как в эу-, так и в прокариотических клетках.

Выводы.

Разработка быстрых и эффективных методов химического лигирования, которые можно воспроизводить, расширит область применения. В настоящее время существует множество оборудования и методов, доступных для синтеза сложных структур и доставки упаковки, поэтому мы хотим установить некоторые из новых научных концепций об активности таких модифицированных олигонуклеотидов в клетках. Для клинического использования классы олигонуклеотидов зависят от химической модификации для повышения устойчивости к нуклеазам.

Мы предположили, что дезоксирибозимы / антисмысловые олигонуклеотиды, модифицированные триазолом, будут демонстрировать более высокую активность и стабильность во всех типах клеток (эу- / прокариотических) по сравнению с фосфоротиоатными моделями, даже при использовании без дополнительной РНКазы Н. Для наших целей нам понадобился функциональный ДНКзим, который выполнил свои функции как в эу- /, так и в прокариотических клетках, а также *in vitro* в присутствии РНКазы Н. В рамках этой диссертации мы разработали новые дезоксирибозимы, модифицированные «кликком», способные выполнять необходимые функции расщепления, подтвержденные спектрофотометрическими анализами в пробирках *ex vivo*.

В своей магистерской диссертации, мы предлагаем несколько оригинальных способов решения проблем устойчивости ДНК-зимов в клетках и организмах.

1. Todd AV, Fuery CJ, Impey HL, Applegate TL, Haughton MA. DzyNA-PCR: use of DNAzymes to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format. *Clin Chem*. 2000 May;46(5):625-30. PMID: 10794743.
2. Mégane Debiais, Amandine Lelievre, Michael Smietana, Sabine Müller, Splitting aptamers and nucleic acid enzymes for the development of advanced biosensors, *Nucleic Acids Research*, Volume 48, Issue 7, 17 April 2020, Pages 3400–3422, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa132>
3. El-Sagheer, A. H., & Brown, T. (2012). Click Nucleic Acid Ligation: Applications in Biology and Nanotechnology. *Accounts of Chemical Research*, 45(8), 1258–1267. doi: 10.1021/ar200321n
4. Efthymiou, T., Gong, W., & Desaulniers, J.-P. (2012). Chemical Architecture and Applications of Nucleic Acid Derivatives Containing 1,2,3-Triazole Functionalities Synthesized via Click Chemistry. *Molecules*, 17(11), 12665–12703. doi: 10.3390/molecules171112665

Каренко А.С. (автор)

Подпись

Колпашиков Д.М. (научный руководитель)

Подпись