

## ОПТИМИЗАЦИЯ ДНК МАШИН ДЛЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ РНК РАКОВЫХ КЛЕТОК

А.Ю. Кальнин, Д.Д. Недорезова (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург)

Научный руководитель: Д.М. Колпащиков, к.х.н., профессор (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург)

Одним из самых распространённых заболеваний в мире и основных причин смертности является рак [1]. Существующие на сегодняшний день подходы к терапии рака не гарантируют полного излечения пациентов. Способы, относящиеся к генной терапии, действующие на опухоль на молекулярном уровне, имеют недостатки, среди которых низкая эффективность и недостаточная селективность препаратов.

Одним из возможных методов борьбы с раком можно назвать дезоксирибозимы – короткие ДНК цепи, способные расщеплять фосфодиэфирные связи в молекулах РНК [2]. Нашей задачей является дизайн и оптимизация многофункциональных ДНК ассоциатов (ДНК машины), содержащих каталитически активные ДНК – дезоксирибозимы. ДНК машины могут расщеплять матричную РНК жизненно важных генов в присутствии сигнальных молекул-маркеров раковых клеток, что потенциально решает проблему селективности и эффективности генной терапии [3].

В недавно вышедшей статье [4] наша научная группа предложила ДНК машину для лечения нейробластомы. Однако исследованные конструкции имели недостаточно высокую эффективность и были способны быстро расщеплять только молекулы субстрата со скоростью порядка 0,3 молекулы в час ( $0.3 \cdot 1/\text{ч}$ ), тогда как теоретический предел –  $10 \cdot 1/\text{ч}$ . Причиной пониженной эффективности послужила недостаточная оптимизация ДНК машины. Задачей этой работы является увеличение эффективности ДНК машин за счёт оптимизации их дизайна.

Эффективность работы дезоксирибозимов и конструкций на их основе зависит от длины субстрат-связывающих участков молекулы. Слишком короткие участки не позволят эффективно присоединиться к субстрату, тогда как чрезмерно длинные распознающие участки будут неспособны высвободить продукты расщепления. Таким образом, существует оптимальная длина субстрат-связывающих участков, обеспечивающая наибольшую эффективность фермента [5]. Кроме того, эффективность фермента зависит от его концентрации.

Цель работы: оценить эффективность различных вариаций дезоксирибозимов и ДНК машин и найти оптимальную для функционирования фермента длину участков связывания РНК мишени.

В качестве РНК мишени выбрана матричная РНК (мРНК) гена зелёного флуоресцентного белка GFP (green fluorescent protein). Данный ген введён в культуру человеческих клеток для удобства слежения за его ингибированием. Расщепление его мРНК приведёт к остановке производства белка, из-за чего клетки частично или полностью утратят способность к флуоресценции. Данная система является очень для оценки качества работы ДНК-конструкций. Результаты оптимизации дезоксирибозимов на субстрате мРНК GFP можно будет в дальнейшем использовать для работы с терапевтически важными мРНК-мишенями.

В данной работе проведена оптимизация одиночных дезоксирибозимов 10-23 и сплит-дезоксирибозимов, проявляющих активность только после присоединения к биомаркерной последовательности N-Мус. Эффективность ферментов оценивалась по расщеплению участка мРНК GFP длиной 60 нуклеотидов, меченого флуоресцентной меткой. Степень разрезания

мРНК гена GFP оценивали при помощи денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза спустя 1, 5 и 24 часа инкубации при температуре 37 °С в буфере с физиологическим содержанием ионов: 150 мМ К<sup>+</sup>, 15 мМ Na<sup>+</sup> и 2 мМ Mg<sup>2+</sup> (рН=7,4).

В ходе экспериментальной работы было показано, что при длине распознающих участков в 10-11 пар оснований эффективность дезоксирибозимов обоих типов оптимальна.

Поскольку дезоксирибозимы являются ключевыми функциональными элементами разрабатываемых ДНК машин, результаты данной работы могут в дальнейшем быть использованы для создания наиболее эффективных ДНК роботов. Результаты этой работы могут создать основу для создания ДНК роботов для терапии рака.

#### Список использованной литературы

1. ВОЗ. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. — 2016. — Режим доступа: <http://www.who.int/ru/>, свободный.
2. Breaker R.R., Joyce J.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA, *Chem. Biol.*, 1: 223-229.
3. Cox A.J., Bengtson H.N., Rohde K.H., Kolpashchikov D.M. (2016) DNA nanotechnology for nucleic acid analysis: multifunctional molecular DNA machine for RNA detection, *Chem. Соттип. (CatB)*, 52(99): 14318-14321.
4. Daria Nedorezova, Anna F. F Fakhardo Kolpashchikov D.M. (2018) Towards DNA Nanomachines for Cancer Treatment: Achieving Selective and Efficient Cleavage of Folded RNA *Angew. Chem.*. Accepted Author Manuscript.
5. Stephen W. Santoro and Gerald F. Joyce (1998) Mechanism and Utility of an RNA-Cleaving DNA Enzyme, *Biochemistry*, 37, 13330-13342