

МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ ДНКЗИМЫ ДЛЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ ЦЕЛЕВОЙ РНК

Дубовиченко М.В. (Университет ИТМО), Батса М. (Университет ИТМО)

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

Была проведена исследовательская работа по разработке мультивалентных модификаций ДНК-ферментов Dz 10-23 (ДНКзимов), каталитически расщепляющих целевые стабильно структурированные РНК. По сравнению с моновалентными (одиночными) ДНКзимами, мультивалентные ДНКзимы повысили расщепление до 13 раз в условиях кинетики множественных оборотов и до 5 раз при кинетике одного оборота.

Введение. За последние 40 лет терапевтические нуклеиновые кислоты (ТНК) получили широкое распространение в исследовательских работах, как потенциальные лекарства для терапии заболеваний на уровне экспрессии генов. К настоящему моменту известны следующие виды ТНК: антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), малые интерферирующие РНК (миРНК), каталитические нуклеиновые кислоты (рибозимы, ДНКзимы). Эффективность действий ТНК обусловлена комплементарным взаимодействием короткой одноцепочечной НК (РНК или ДНК) с мРНК целевых болезнетворных генов с их последующей деградацией с участием нуклеаз. Однако, общим недостатком всех ТНК является низкое сродство к РНК в её сложенном состоянии или если она ассоциирована с белками. Текущими решениями этих недостатков являются выбор целевого участка РНК посредством компьютерного анализа и химические модификации цепей. Однако, компьютерный анализ к настоящему времени не дает 100%-го предсказания эффективного взаимодействия НК с целевой РНК, а химические модификации могут провоцировать иммунный ответ и расщепление нецелевых РНК. В нашей работе предлагаем использование мультивалентности – особенности терапевтического препарата, молекула которого способная взаимодействовать сразу с несколькими молекулами-мишенями. На основе ДНКзимов мы разработали их мультивалентные модификации – бивалентные ДНКзимы, способные эффективно расщеплять сложенную РНК лучше, чем это делают классические моновалентные ДНКзимы.

Основная часть.

ДНКзимы – каталитические нуклеиновые кислоты, представляющие собой короткие цепи ДНК, состоящие из двух РНК-связывающих доменов и цепи находящейся между доменами, формирующей каталитическое ядро. РНК-связывающие домены комплементарно связываются с целевым участком РНК, а формирующееся каталитическое ядро в присутствии ионов магния Mg^{2+} катализирует лиазное расщепление фосфодиэфирной связи у РНК между гуанозином и уридином (G-U). Взяв за основу ДНКзимы, мы разработали их бивалентные модификации (BDD). Их, в качестве ферментов (E), мы исследовали на способность расщеплять субстрат (S) в виде целевых РНК-фрагментов с разной стабильностью (dG): меченые флуоресцеином (FAM) на 5'-конце EIF3C-60 (dG = -6.30 ккал/моль) и STR-58 (dG = -23.60 ккал/моль), а также немеченая STR-104 (dG = -48.24 ккал/моль). BDD – это два функциональных ДНКзима, которые в качестве субъединиц S1 и S2 ассоциированы друг с другом в одной молекуле. Мы разработали три модификации BDD, отличающихся по способу ассоциации между собой субъединиц S2 и S1: BDD-1, BDD-2, BDD-3. В BDD-1 у S1 и S2 фосфодиэфирная связь проходит через линкер на концах 5' и 3'. У BDD-2 S1 и S2 ассоциированы через водородные связи между «хвостовыми» цепями на концах 3' и 3', а у BDD-3 это происходит на концах 5' и 3'. Мы испытали все три BDD в условиях кинетики одного и множественных оборотов с использованием околофизического буфера (15 mM NaCl, 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM HEPES (pH 7.4)) и сравнивали их

эффективность с моновалентными ДНКзимами. При исследовании BDD с мишенью малой стабильности EIF3C-60 ($dG = -6.30$ ккал/моль) в условиях кинетики одного оборота ($[S] = 1$ μM , $[E] = 2$ μM , $t = 5$ мин, 15 мин) установили, что BDD-1 показали скорость расщепления РНК = 0.092 мин^{-1} и 0.067 мин^{-1} , что на 270% и 198% больше, чем демонстрировал мультивалентный ДНКзим Dz1 (0.024 мин^{-1}), соответственно. Однако, при кинетике множественных оборотов ($[S] = 1$ μM , $[E] = 10$ nM , $t = 1, 5$ и 24 ч) ни один из BDD не показал превосходства в каталитическом расщеплении РНК по сравнению с Dz1. Только BDD-2 показал самое высокое расщепление РНК из всех BDD, что составило $\sim 85\%$ от расщепления Dz1, что по числу оборотов равно 3.3 ч^{-1} против 3.8 ч^{-1} , соответственно. Мы полагаем, что это связано с ухудшившейся диссоциации BDD-1 от продуктов расщепленной РНК, что ингибировало дальнейшую каталитическую активность BDD. Далее мы провели исследование BDD с более стабильной мишенью STR-58 (-23.60 ккал/моль). При кинетике одного оборота ($[S] = 1$ μM , $[E] = 2$ μM , $t = 5$ мин, 15 мин) BDD-1 и BDD-3 продемонстрировали улучшение расщепления РНК по сравнению с Dz1: 0.021 мин^{-1} и 0.023 мин^{-1} против 0.002 мин^{-1} , что больше в 9 и 10 раз соответственно. При кинетике множественных оборотов ($[S] = 1$ μM , $[E] = 100$ nM , $t = 1, 5$ и 24 ч) все три BDD (BDD-1, BDD-2 и BDD-3) продемонстрировали высокую эффективность каталитического расщепления РНК: числа оборотов = 0.87 ч^{-1} , 0.22 ч^{-1} , и 0.39 ч^{-1} , что в 13, 4 и 6 раз больше, чем Dz1 (0.06 ч^{-1}), соответственно. Следующим этапом было исследование каталитического действия BDD с самой стабильной мишенью STR-104 ($dG = -48.24$ ккал/моль). Для сравнения мы использовали лучший бивалент BDD-1 и разработанный на его основе тривалентный ДНКзим TDD с тремя ДНКзимами (S1, S2, S3), ассоциированными фосфодиэфирными связями друг с другом на 5' и 3' концах. Реакция расщепления проводилась в условиях кинетики множественных оборотов ($[S] = 1$ μM , $[E] = 2$ μM , $t = 1, 5$ и 24 ч). Примечательно, что только TDD продемонстрировал значимое расщепление с числом оборотов = 0.09 ч^{-1} , в то время, как BDD-1 совсем не показал значимого расщепления. Таким образом можно сказать, что мультивалентность действительно позволяет увеличивать сродство ДНКзимов с целевой РНК и эффективно расщеплять её.

Выводы. Проведенные эксперименты показали, что внедрение мультивалентности в структуру ДНКзимов позволяет увеличить их расщепляющую способность в несколько раз (До 13 раз при множественных оборотах с РНК-мишенью средней стабильности STR-58). В дальнейших планах планируется исследование специфичности связывания мультивалентных ДНКзимов с РНК, а также исследования их расщепления мРНК внутри клеточных линий. В случае успехов у дальнейших экспериментальных работах, мультивалентные ДНКзимы могут претендовать на использование их в качестве новых модифицированных и более эффективных ТНК в терапии заболеваний.