

## ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ ДНКзимы 10–23

А.А. Фокина<sup>1</sup>, А.Н. Зенков<sup>1</sup>, М.А. Зенкова<sup>1</sup>, А.Г. Веняминова<sup>1</sup>,  
Ж.-К. Франсуа<sup>2</sup>, В.В. Власов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия, e-mail: ven@niboch.nsc.ru;

<sup>2</sup> Отдел регуляции, развития и молекулярного разнообразия при Национальном музее  
естественной истории, 75231, Париж, Франция

ДНКзимы представляют собой новый класс каталитически активных нуклеиновых кислот, способных сайт-специфично расщеплять РНК. В данной работе предложен подход к созданию РНК-расщепляющих конструкций на основе ДНКзима 10–23, обладающих повышенной каталитической активностью и устойчивостью в биологических средах. Создана серия новых двухкомпонентных ДНКзимов, направленных на мРНК генов *mdr1* и *igf 1*, состоящих из ДНКзима 10–23 и 3'-модифицированных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов)-эффекторов, обладающих высоким сродством по отношению к РНК и высокой нуклеолитической устойчивостью. Созданные конструкции способны расщеплять как модельные синтетические фрагменты мРНК, так и протяженные структурированные РНК транскрипты в условиях, близких к физиологическим.

Разработка эффективных подходов к направленному воздействию на нуклеиновые кислоты является актуальной задачей современной молекулярной биологии, биотехнологии и фундаментальной медицины. Недавно методом селекции *in vitro* были найдены последовательности ДНКзимов – олигодезоксирибонуклеотидов с характерной вторичной структурой, способных катализировать сайт-специфичное расщепление РНК (см. обзор Silverman, 2005). Наиболее эффективным из них оказался ДНКзим 10–23, в состав которого входит консервативный каталитический кор, фланкированный двумя переменными последовательностями олигодезоксирибонуклеотидов, отвечающих за комплементарное узнавание РНК-мишени. В присутствии двухвалентных ионов магния этот ДНКзим специфично гидролизует фосфодиэфирную связь в РНК, находящуюся между неспаренным пурином (R) и спаренным пиримидином (Y) (рис. 1).

ДНКзимы 10–23 были успешно использованы многими исследователями для подавления экспрессии определенных генов *in vivo*, а также для решения таких задач, как детекция и коли-

чественное определение уровня мРНК при проведении диагностических анализов; выявление однонуклеотидных мутаций в молекуле РНК; картирование протяженных РНК-мишеней с целью выбора участков, доступных для расщепления, и др. (Joyce, 2001; Silverman, 2005). Таким образом, ДНКзимы 10–23 можно рассматривать как новые прецизионные инструменты молекулярно-биологических исследований и перспективные терапевтические препараты. Однако на практике стратегия подавления экспрессии определенных генов с использованием ДНКзимов столкнулась с целым рядом затруднений.

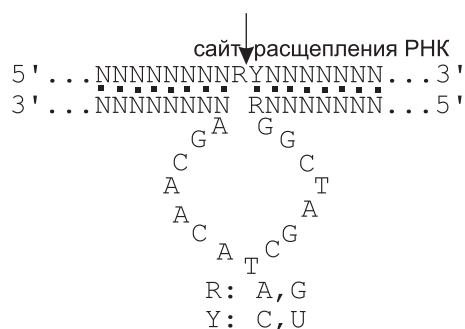


Рис. 1. Комплекс РНК-ДНКзим 10–23.

Это привело к тому, что для каждой конкретной мРНК-мишени требуется экспериментальный подбор оптимальной структуры этих искусственных эндорибонуклеаз.

Появление у опухолевых клеток фенотипа множественной лекарственной устойчивости, заключающегося в приобретении клетками опухоли резистентности к широкому спектру химиотерапевтических препаратов, часто обусловлено гиперэкспрессией гена *mdr1*, кодирующего трансмембранный белок Р-гликопротеин, выводящий из клетки разнообразные соединения, в том числе и препараты, используемые в химиотерапии рака (Ставровская, 2000). Ингибирование экспрессии гена *mdr1* является наиболее прямым подходом для преодоления синдрома множественной лекарственной устойчивости. Нами впервые были сконструированы ДНКзимы 10–23 для направленного расщепления мРНК этого гена (Кузнецова и др., 2002; Kuznetsova *et al.*, 2003; Fokina *et al.*, 2004; Веньямина и др., 2004). На основании литературных данных о специфичности расщепления РНК ДНКзимом 10–23 (Santoro, Joyce, 1997) и сведений о доступных для гибридизации с олигонуклеотидами участках в структуре 700-звенного 5'-концевого фрагмента MDR1 мРНК (Kostenko *et al.*, 2000) были созданы ДНКзимы 10–23, комплементарные трем различным участкам MDR1 мРНК (нуклеотиды 120–137,

127–145 и 319–335), содержащим сайты 5'-GC-3' и 5'-GU-3' (рис. 2).

Для повышения стабильности олигодезоксирибонуклеотидов в биологических средах на их 3'-конец вводили тимидин ( $T_{inv}$ ), присоединенный посредством «инвертированной» 3'-3' межнуклеотидной связи (Ramalho Ortigao *et al.*, 1992).

Как видно из представленных данных по расщеплению синтетических фрагментов мРНК созданными ДНКзимными конструкциями (табл. 1), для ДНКзимов, комплементарных разным участкам мРНК гена *mdr1*, значения кинетических констант и общая каталитическая эффективность расщепления различны. Это связано как с различиями в прочности дуплекса ДНКзим – РНК, так и с возможным формированием собственной внутренней вторичной структуры ДНКзима и РНК-мишени, а также с различиями в скоростях формирования активной конформации ДНКзим-субстратного комплекса, в котором и происходит расщепление. Максимальной каталитической активностью обладали ДНКзимы серии 127, направленные на РНК-мишень, содержащую наиболее чувствительный к расщеплению сайт 5'-GU-3, что согласуется с литературными данными (Joyce, 2001). Интересно отметить, что наличие на 3'-конце ДНКзимов «инвертированного» остатка тимидина либо не влияло на каталитичес-

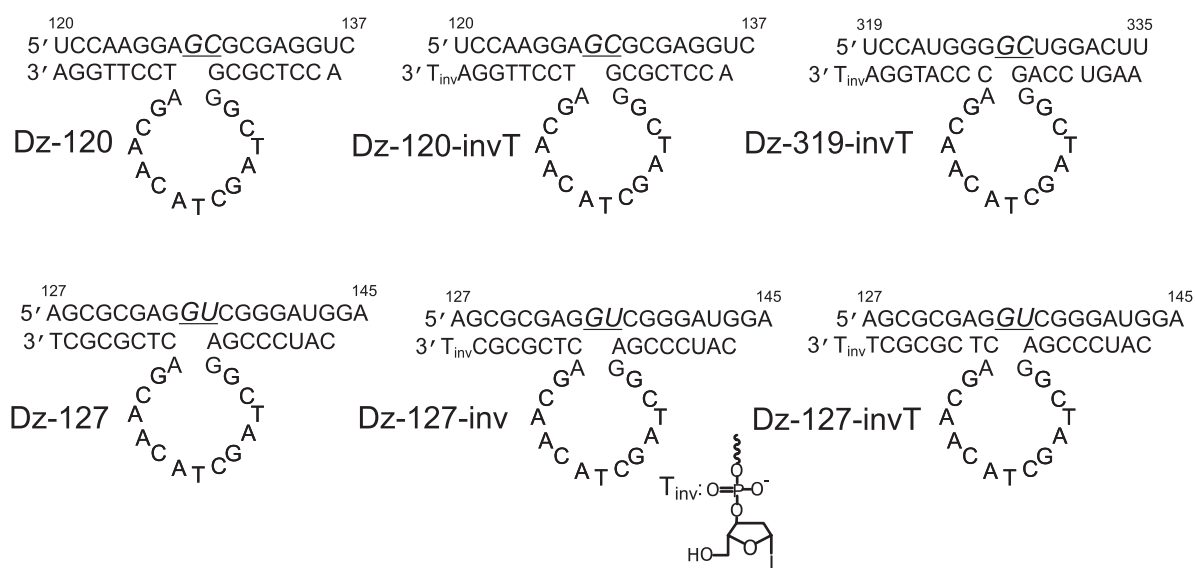


Рис. 2. ДНКзимы для расщепления MDR1 мРНК.

Таблица 1

## Кинетические характеристики расщепления синтетических фрагментов MDR1 мРНК ДНКзимами

Участок MDR1 мРНК	ДНКзим	$K_m$ , нМ	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , мин <sup>-1</sup> ·мкМ <sup>-1</sup>
120–137	Dz-120	95,0 ± 6,4	0,021 ± 0,001	0,22
120–137	Dz-120-invT	23,8 ± 7,4	0,025 ± 0,002	1,1
319–333	Dz-319-invT	111,8 ± 2 5,0	0,091 ± 0,014	0,81
127–145	Dz-127	67,0 ± 26,6	0,60 ± 0,06	8,9
127–145	Dz-127-inv	67,5 ± 16,3	0,50 ± 0,08	7,4
127–145	Dz-127-invT	24,0 ± 1,3	0,24 ± 0,01	10,0

Примечание. Определение кинетических параметров проводили в каталитическом режиме. Условия реакции: 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С; концентрации ДНКзима и РНК 10 нМ и 50–500 нМ соответственно.

кую эффективность расщепления, либо увеличивало ее.

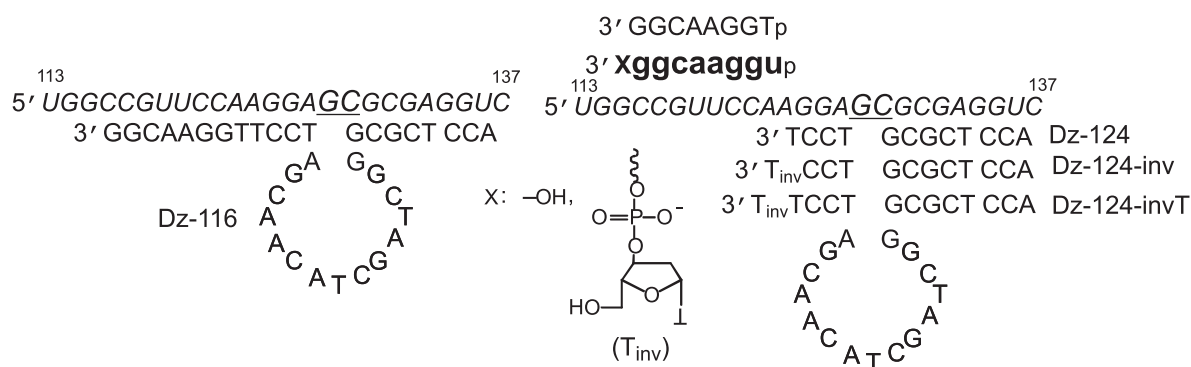
Конструкции, обладающие наиболее высокой каталитической активностью (Dz-120-invT, Dz-127-inv, Dz-127-invT), были использованы для расщепления протяженного 190-звенного транскрипта MDR1 мРНК (Kovalev *et al.*, 2003). Оказалось, что максимальная степень гидролиза РНК в этом случае достигалась при использовании ДНКзима Dz-127-inv (значение общей каталитической эффективности  $k_{cat}/K_m$  0,1 мин<sup>-1</sup>·мкМ<sup>-1</sup>). Этот ДНКзим был способен также расщеплять полноразмерную мРНК гена *mdr1* в составе суммарной клеточной РНК (40 % за 6 ч инкубации, концентрация ДНКзима 1 мМ), выделенной из культуры клеток линии KB-8-5, характеризующейся гиперэкспрессией гена *mdr1*.

Одной из главных проблем, возникающих при расщеплении протяженных структурированных РНК-мишеней ДНКзимами, является доступность мРНК в участке связывания ДНКзима. С целью решения этой проблемы мы использовали подход, основанный на применении коротких олигонуклеотидов-эффекторов, которые комплементарно связываются с РНК-мишенью и являются «продолжением» субстрат-связывающих участков ДНКзима. Ранее (см. обзор Amarguioi, Prydz, 1998; Novig *et al.*, 2001) было продемонстрировано использование эффекторов такого типа для повышения

каталитической активности рибозима «головка молотка». Влияние олигодезоксирибонуклеотидов-эффекторов на каталитическую активность ДНКзимов 10–23 описано в работе (Horn, Schwenzer, 1999) на примере расщепления модельного синтетического РНК-субстрата.

Нами была сконструирована серия новых двухкомпонентных ДНКзимов 10–23, представляющих собой ДНКзим с «укороченным» 3'-концевым субстрат-связывающим участком (Dz-124) либо его аналоги, содержащие на 3'-конце остаток «инвертированного» тимидина (T<sub>inv</sub>) (Dz-124inv, Dz-124invT), и олигонуклеотиды-эффекторы, способные связываться с РНК-мишенью «встык» с 3'-концом ДНКзима (рис. 3). В качестве эффекторов нами были выбраны олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) и их 3'-«инвертированные» аналоги благодаря наличию у них высокого сродства к РНК и повышенной стабильности в биологических средах (Novopashina *et al.*, 2001).

Результаты, полученные при расщеплении синтетического фрагмента MDR1 мРНК двухкомпонентными системами в зависимости от длины эффекторов (гекса-, окта- и декамеров), позволяют считать, что использование окта(2'-О-метилрибонуклеотида) является оптимальным. При этом максимальная степень расщепления РНК составляла 80–85 % за 4 часа инкубации (рис. 4а). Исследовано влияние типа эффектора на каталитическую активность двух-



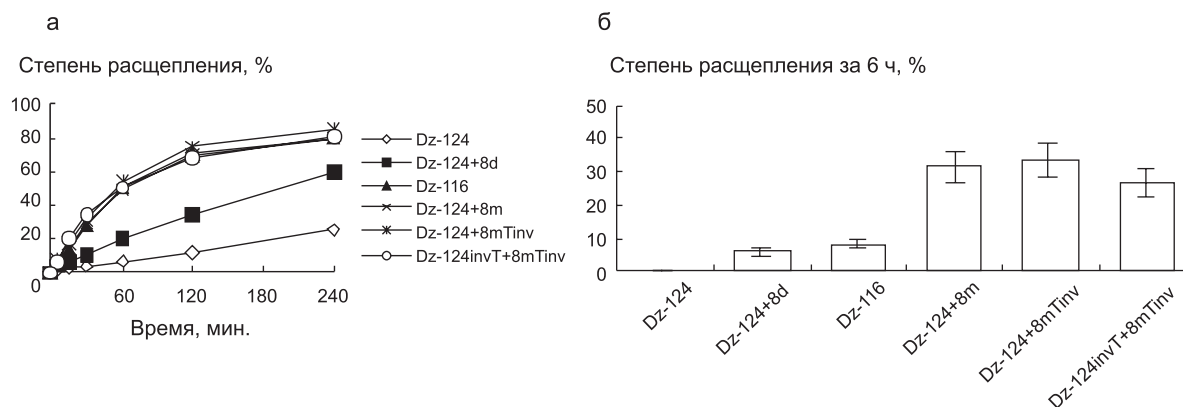
**Рис. 3.** Двухкомпонентные ДНКзимы для расщепления MDR1 мРНК.

Обозначения нуклеотидов в последовательностях ДНКзимов: N – дезоксирибонуклеотид; N – рибонуклеотид; п – 2'-О-метилрибонуклеотид.

компонентных систем. Как видно из данных, представленных в табл. 2, значение каталитической эффективности ( $k_{cat}/K_m$ ) для «укороченного» ДНКзима Dz-124 возрастает более чем в 100 раз в случае добавления в систему окта(2'-О-метилрибонуклеотида (8m) или удлинения 3'-субстрат-связывающего участка ДНКзима на 8 дезоксирибонуклеотидов (Dz-116) и только в 4 раза при использовании в качестве эффектора октадезоксирибонуклеотида (8d). В каталитическом режиме использование двухкомпонентной системы в составе с 2'-О-метилоктамером (8m) или его 3'-модифицированным аналогом (8mTinv) приводит к максимальной степени расщепления, значительно превосходящей степень расщепления РНК всеми другими исследованными конструкциями (рис. 4б).

Присутствие на 3'-конце эффектора «инвертированного» тимидина (T<sub>inv</sub>), повышающего стабильность олигонуклеотидов к 3'-экзонуклеазам в биологических средах, не снижает активности двухкомпонентных систем (рис. 4, табл. 2). Однако в случае конструкций (Dz-124inv+8m) и (Dz-124+8mTinv) присутствие такой модификации на 3'-конце ДНКзима приводило к существенному снижению значения общей каталитической эффективности системы.

Значения кинетических параметров (табл. 2) свидетельствуют о том, что добавление в систему эффекторов или удлинение 3'-субстрат-связывающего участка ДНКзима способствует понижению значения константы Михаэлиса и незначительному повышению значения константы  $k_{cat}$ . Таким образом, в данном



**Рис. 4.** Расщепление синтетического фрагмента MDR1 мРНК (нуклеотиды 113–137) двухкомпонентными ДНКзимами.

50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С. Концентрации ДНКзима, РНК, эффекторов 8d и 8m (8mTinv): (а) 500 нМ, 50 нМ, 5 μМ и 75 нМ соответственно; (б) 5 нМ, 50 нМ, 5 μМ и 75 нМ соответственно.

Таблица 2

Кинетические параметры расщепления фрагмента MDR1 мРНК (нуклеотиды 113–137) двухкомпонентными ДНКзимами (рис. 3)

ДНКзим	$K_m$ , нМ	$k_{cat} \times 103$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , мМ <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>
Dz-124	2113 ± 333	1,86 ± 0,19	1
Dz-124+8d	910 ± 116	4,01 ± 0,26	4
Dz-124+8m	39 ± 3	4,56 ± 0,05	117
Dz-124+8mTinv	39 ± 6	4,10 ± 0,08	105
Dz-116	30 ± 2	4,16 ± 0,03	138
Dz-124inv+8m	179 ± 20	1,00 ± 0,03	6
Dz-124inv+8mTinv	98 ± 7	1,17 ± 0,03	12
Dz-124invT+8m	30 ± 4	2,60 ± 0,04	87
Dz-124invT+8mTinv	28 ± 4	3,00 ± 0,05	107

Примечание. Определение кинетических параметров проводили в условиях избытка ДНКзима. Условия реакции: 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С; концентрации РНК, ДНКзима и эффекторов 8м (8mTinv) и 8d составляли 50 нМ, 100 нМ – 2 мМ, 75 нМ и 5 мМ соответственно.

случае влияние эффектора заключается, прежде всего, в повышении сродства «укороченного» ДНКзима к РНК-субстрату, т. е. добавление эффектора в систему приводит к значительному смещению равновесия реакции в сторону образования комплекса ДНКзим·РНК за счет дополнительных стэкинг-взаимодействий (кооперативный контакт), возникающих на стыке дуплексов эффектор·РНК и ДНКзим·РНК.

Мы предполагаем, что полученные результаты объясняются наличием различных типов кооперативных взаимодействий. Возможно, что в двухкомпонентной системе, содержащей ДНКзим Dz-124inv, реализация кооперативного контакта происходит наименее эффективно.

Попытка дополнительной стабилизации комплекса РНК·ДНКзим·эффектор путем введения на 5'-конец эффектора интеркалятора N-(2-гидроксиэтил)феназиния не привела к повышению каталитической активности двухкомпонентных систем.

Оптимальным вариантом, с нашей точки зрения, для расщепления мРНК является использование ДНКзима Dz-124invT в сочетании с 3'-модифицированным окта(2'-О-метилрибонуклеотидом) (8mTinv) (рис. 4, табл. 2). В таком варианте система обладает максимальной эффективностью расщепления и будет максимально стабильной в биологических средах.

Полученные данные подтверждают правильность предложенной нами стратегии создания двухкомпонентных ДНКзимов.

В качестве второго объекта была выбрана мРНК гена IGF I. Инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I) представляет собой полипептид, непосредственно вовлеченный в процессы клеточной дифференциации и пролиферации. Показано, что этот фактор является потенциальным ингибитором апоптоза. Гиперэкспрессия гена IGF-I приводит к злокачественному перерождению клетки (см. обзор Pollak *et al.*, 2004). Нами впервые проведен дизайн ДНКзимных конструкций с повышенной каталитической активностью для расщепления мРНК гена инсулино-подобного фактора роста IGF I (Fokina *et al.*, 2005).

Оптимизирована длина субстрат-узнающих участков ДНКзимов. С этой целью были созданы 3 серии ДНКзимов с различной длиной фланкирующих доменов (8–10 нуклеотидов; расчетное значение  $-\Delta G_{37}^{\circ}$  8–10 ккал/моль (Joyce, 2001)), комплементарных трем участкам IGF I мРНК (**GAEL**, **KPT**, **FRS**) (рис. 5, табл. 3). Изучено расщепление этих синтетических фрагментов IGF I мРНК (**GAEL** (25-мер), **KPT** (21-мер), **FRS** (24-мер)) созданными ДНКзимами (табл. 3) в условиях, близких к физиологическим, как в каталитическом режиме, так

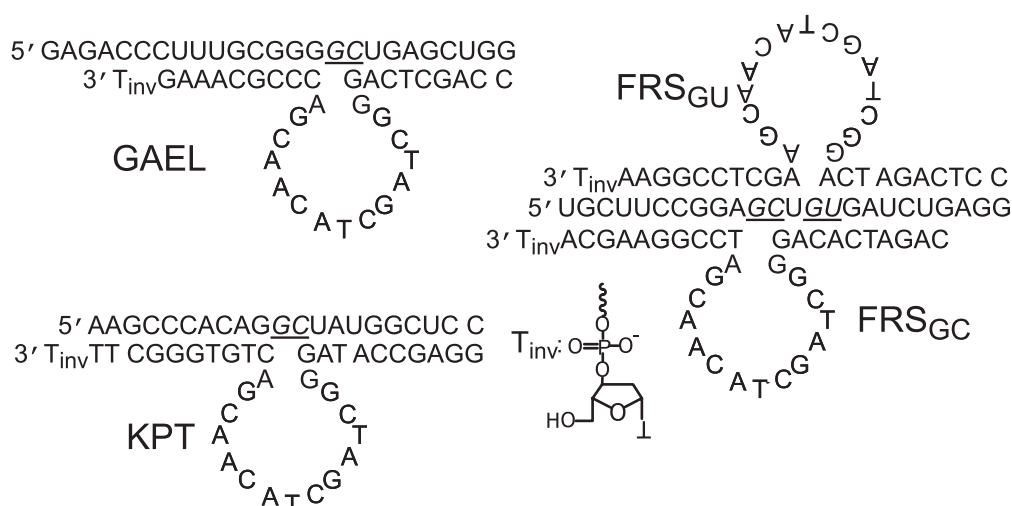


Рис. 5. ДНКзимы для расщепления IGF I мРНК.

Таблица 3

Каталитическая активность немодифицированных ДНКзимов

ДНКзим 3'/5'		$-\Delta G_{37}^{\circ}$ ккал·моль <sup>-1</sup> 3'/5'	$k_{obs}^{a)}$ мин <sup>-1</sup>	$V_0 \cdot 10^{(b)}$ нМ·мин <sup>-1</sup>
3'-T <sub>inv</sub> CGGGTGTCLGATACCGA-5'	<b>KPT88</b>	9,5/7,4	0,010 ± 0,003	0,26 ± 0,01
3'-T <sub>inv</sub> TCGGGTGTCLGATACCGAG-5'	<b>KPT99</b>	11,3/8,9	0,024 ± 0,007	0,80 ± 0,05
3'-T <sub>inv</sub> TTCGGGTGTCLGATACCGAGG-5'	<b>KPT1010</b>	12,3/11	0,036 ± 0,008	0,76 ± 0,04
3'-T <sub>inv</sub> AAAGCCCCLGACTCGAC-5'	<b>GAEL88</b>	9,1/7,7	—	0,068 ± 0,003
3'-T <sub>inv</sub> GAAAGCCCCLGACTCGACC-5'	<b>GAEL99</b>	10/10,6	0,064 ± 0,009	2,1 ± 0,1
3'-T <sub>inv</sub> CGAAGGCCTLGACACTAGA-5'	<b>FRS<sub>GC</sub>99</b>	10,2/6,7	0,015 ± 0,002	0,70 ± 0,01
3'-T <sub>inv</sub> CGAAGGCCTLGACACTAGAC-5'	<b>FRS<sub>GC</sub>910</b>	10,2/8,3	0,024 ± 0,004	0,45 ± 0,05
3'-T <sub>inv</sub> ACGAAGGCCTLGACACTAGAC-5'	<b>FRS<sub>GC</sub>1010</b>	11,8/8,3	0,026 ± 0,005	0,80 ± 0,03
3'-T <sub>inv</sub> AGGCCTCGALACTAGACT-5'	<b>FRS<sub>GU</sub>98</b>	11,8/6	0,18 ± 0,01	3,0 ± 0,1
3'-T <sub>inv</sub> AGGCCTCGALACTAGACTC-5'	<b>FRS<sub>GU</sub>99</b>	11,8/7,8	0,70 ± 0,07	12,7 ± 0,6
3'-T <sub>inv</sub> AAGGCCTCGALACTAGACTCC-5'	<b>FRS<sub>GU</sub>1010</b>	12/10,7	2,0 ± 0,2	22 ± 2

Примечание. 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С;

а) 10 нМ РНК, 100 нМ ДНКзим; б) 100 нМ РНК, 10 нМ ДНКзим; L – последовательность каталитического кора 5'GGCTAGCTACAACGA.

и в условиях избытка ДНКзима по отношению к РНК.

Как видно из представленных данных (табл. 3), увеличение длины субстрат-связывающих доменов ДНКзима во всех случаях способствует повышению эффективности расщепления РНК. При этом максимальной каталитической активностью обладают ДНКзимы серии **FRS**,

направленные на наиболее чувствительный к расщеплению сайт 5'-**GU**-3' (Joyce, 2001).

Замена в последовательности ДНКзима гуанозина, примыкающего к каталитическому кору, на инозин приводит к росту каталитической активности (Cairns *et al.*, 2003). Поэтому для повышения каталитической активности ДНКзимов, направленных на наименее чувствительный

к расщеплению сайт 5'-**GC**-3', нами была сконструирована серия содержащих инозин ДНКзимов. Как видно из представленных данных (табл. 4), в нашем случае такая модификация в 6–8 раз увеличивает значение константы скорости расщепления фосфодиэфирной связи ( $k_2$ ).

С целью повышения сродства ДНКзимов к РНК и их нуклеолитической устойчивости 4 концевых дезоксирибонуклеотида в 3'- и 5'-

субстрат-связывающих участках ДНКзимов, а также дезоксирибонуклеотиды в неконсервативных позициях каталитического кора (Schubert *et al.*, 2003) были заменены на их 2'-О-метил аналоги (табл. 5).

Сравнивая данные, представленные в табл. 3 и 5, можно заключить, что замены дезоксирибонуклеотидов на их 2'-О-метил аналоги в субстрат-связывающих участках с меньшей

**Таблица 4**  
Каталитическая активность инозин-содержащих ДНКзимов

ДНКзим		$k_2$ , мин <sup>-1</sup>
3'-T <sub>inv</sub> TTCGGGTGTCLGATACCGAGG	<b>KPT1010</b>	0,046 ± 0,009
3'-T <sub>inv</sub> TTCGGGTGTCLIAATACCGAGG	<b>KPT1010I</b>	0,31 ± 0,05
3'-T <sub>inv</sub> GAAAGCCCCLGACTCGACC	<b>GAEL99</b>	0,063 ± 0,011
3'-T <sub>inv</sub> GAAAGCCCCLIACTCGACC	<b>GAEL99I</b>	0,48 ± 0,06
3'-T <sub>inv</sub> ACGAAGGCCTLGACACTAGAC	<b>FRS<sub>GC</sub>1010</b>	0,032 ± 0,003
3'-T <sub>inv</sub> ACGAAGGCCTLIACACTAGAC	<b>FRS<sub>GC</sub>1010I</b>	0,14 ± 0,02

Примечание. 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С; 10 нМ РНК, 8 мкМ ДНКзим; L – последовательность каталитического кора 5'GGCTAGCTACAACGA.

**Таблица 5**  
Каталитическая активность модифицированных ДНКзимов

ДНКзим		$k_2$ , <sup>а)</sup> мин <sup>-1</sup>	$k_{obs}$ , <sup>б)</sup> мин <sup>-1</sup>	$V_0 \cdot 10$ , <sup>в)</sup> нМ·мин <sup>-1</sup>
3'-T <sub>inv</sub> cgggTGTCLGATAccga	<b>KPT88<sub>m</sub></b>	0,036±0,004	0,030±0,008	1,02±0,07
3'-T <sub>inv</sub> cgggTGTCL <sup>m</sup> GATAccga	<b>KPT88<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	0,040±0,004	0,035±0,007	1,01±0,05
3'-T <sub>inv</sub> uucgGGTGTCLGATACCGagg	<b>KPT1010<sub>m</sub></b>	0,042±0,009	0,034±0,007	0,50±0,01
3'-T <sub>inv</sub> uucgGGTGTCL <sup>m</sup> GATACCGagg	<b>KPT1010<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	0,045±0,007	0,037±0,007	0,20±0,02
3'-T <sub>inv</sub> gaaaGCCCCLIACTcgacc	<b>GAEL99<sub>m</sub>I</b>	0,45±0,04	0,40±0,03	10,1±0,1
3'-T <sub>inv</sub> cgaagGCCTLGACACuaga	<b>FRS<sub>GC</sub>99<sub>m</sub></b>	0,033±0,004	0,030±0,004	0,20±0,03
3'-T <sub>inv</sub> cgaagGCCTL <sup>m</sup> GACACuaga	<b>FRS<sub>GC</sub>99<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	0,030±0,003	0,031±0,004	0,30±0,02
3'-T <sub>inv</sub> cgaagGCCTLGACACTagac	<b>FRS<sub>GC</sub>910<sub>m</sub></b>	0,035±0,004	0,031±0,007	0,20±0,01
3'-T <sub>inv</sub> cgaagGCCTL <sup>m</sup> GACACTagac	<b>FRS<sub>GC</sub>910<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	0,033±0,003	0,032±0,005	0,2±0,01
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGALACTAgacu	<b>FRS<sub>GU</sub>98<sub>m</sub></b>	6,8±0,5	1,5±0,2	12,5±0,2
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGAL <sup>m</sup> ACTAgacu	<b>FRS<sub>GU</sub>98<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	4,1±0,3	1,2±0,1	14,5±0,2
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGALACTAgacuc	<b>FRS<sub>GU</sub>99<sub>m</sub></b>	8,3±0,7	2,4±0,2	21,0±0,4
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGAL <sup>m</sup> ACTAgacuc	<b>FRS<sub>GU</sub>99<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	4,0±0,3	1,7±0,1	9,1±0,2

Примечание. 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С; а) 10 нМ РНК, 8 мкМ ДНКзим; б) 10нМ РНК, 100 нМ ДНКзим; в) 100 нМ РНК, 10 нМ ДНКзим; L – последовательность каталитического кора 5'GGCTAGCTACAACGA; L<sup>m</sup> – последовательность модифицированного каталитического кора 5'GgCTAGGcuACaACga; n – 2'-О-метилрибонуклеотиды, N – дезоксирибонуклеотиды. Обозначения нуклеотидов в последовательностях ДНКзимов см. рис. 3.

длиной способствуют повышению эффективности расщепления РНК (ДНКзимы серии **KPT** и **FRS<sub>GU</sub>**). Однако в отдельных случаях введение модификаций во фланкирующие домены приводит к ингибированию скорости расщепления в каталитическом режиме ( $V_0$ ) (ДНКзимы серии **FRS<sub>GC</sub>** и ДНКзим **KPT1010**). Подобный эффект может быть связан с «излишней» стабильностью дуплексов этих участков, что приводит к уменьшению числа оборотов ДНКзима в каталитическом цикле. Следует отметить, что введение модификаций в каталитический кор ДНКзимов серии **FRS<sub>GU</sub>** снижает эффективность расщепления (табл. 5). Возможно, что в этом случае происходит нарушение правильной структуры активной конформации ДНКзим-субстратного комплекса.

Модифицированные ДНКзимы серии **GAEL** и **FRS<sub>GU</sub>**, обладающие максимальной каталитической активностью, были использованы для расщепления протяженного транскрипта IGF I мРНК длиной 364 нуклеотида.

Результаты, приведенные в табл. 6, позволяют считать, что введение 2'-О-Ме нуклеотидов в субстрат-связывающие участки ДНКзимов существенно повышает сродство ДНКзимных конструкций к РНК-транскрипту. Для того чтобы дополнительно увеличить доступность

мРНК в участке связывания ДНКзимов, мы использовали разработанный нами ранее подход (Kuznetsova *et al.*, 2003; Веняминова и др., 2004; Fokina *et al.*, 2004), основанный на применении 3'-модифицированных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов)-эффекторов, связывающихся с РНК-субстратом встык с 3'- или 5'-концом ДНКзима и способных к «разворачиванию» участка его связывания с РНК (рис. 6).

Новые мультикомпонентные системы для направленного расщепления IGF I мРНК состояли из оптимально модифицированного ДНКзима 10–23 и 20-звенных 2'-О-метил олигомеров-эффекторов, содержащих на 3'-конце дополнительный «инвертированный» тимидин ( $T_{inv}$ ).

Как видно из данных, представленных в табл. 7, и вида кинетических кривых на рис. 6, эффективность расщепления протяженного фрагмента РНК, обладающего сложной вторичной структурой, мультикомпонентными ДНКзимами, существенно превышает эффективность расщепления мишени ДНКзимами в отсутствие эффекторов. При этом степень гидролиза РНК зависит от расположения эффектора. Так, в случае конструкций **FRS** серии система типа **ДНКзим·F5'** обладает более высокой каталитической активностью по сравнению

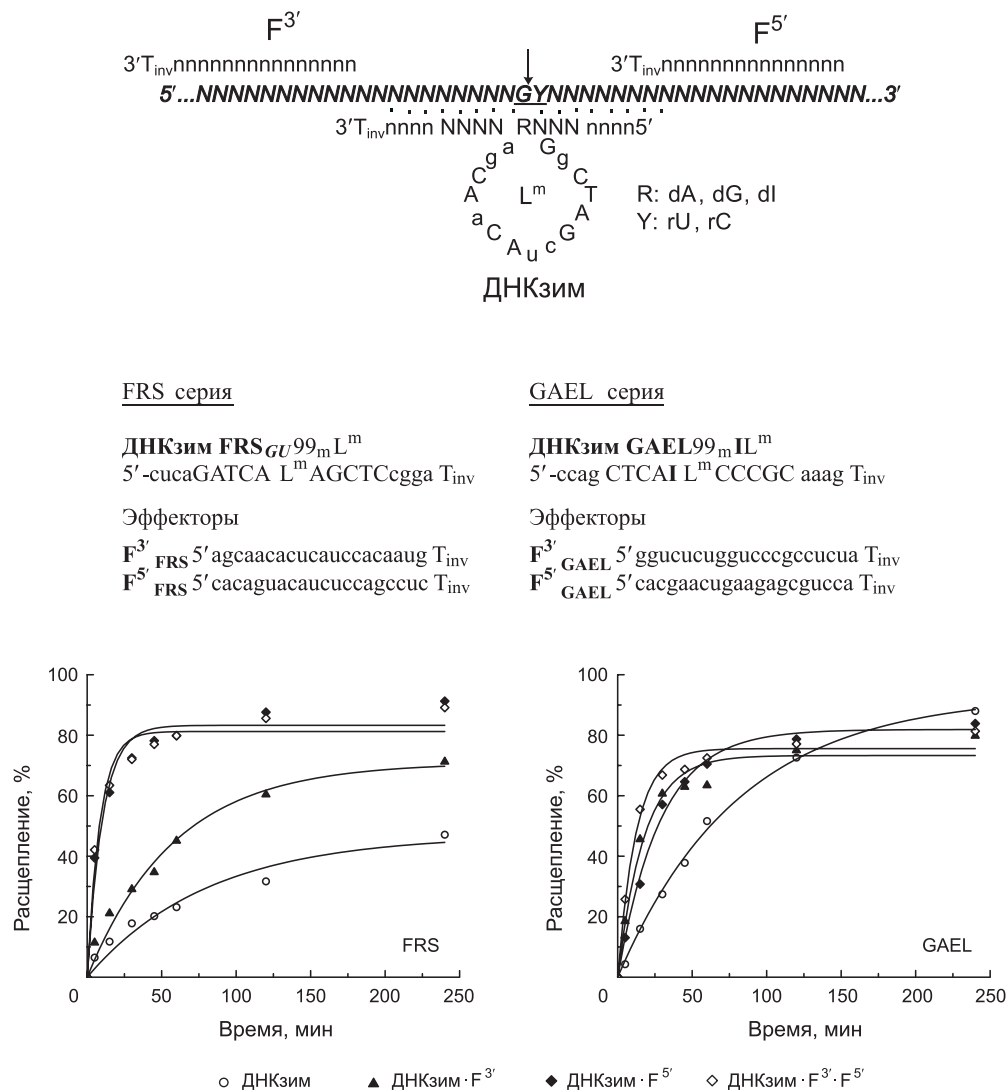
Таблица 6

Значения наблюдаемых констант скорости расщепления транскрипта IGF I мРНК модифицированными ДНКзимами

ДНКзим		$k_{obs}$ , мин <sup>-1</sup>
3'-T <sub>inv</sub> GAAAGCCCCLGACTCGACC	<b>GAEL99</b>	0,004 ± 0,001
3'-T <sub>inv</sub> GAAAGCCCCLIACTCGACC	<b>GAEL99I</b>	0,012 ± 0,002
3'-T <sub>inv</sub> gaaaGCCCCLIACTCgacc	<b>GAEL99 I<sub>m</sub></b>	0,07 ± 0,01
3'-T <sub>inv</sub> cgaaGGCCTLGACACTagac	<b>FRS<sub>GC</sub>910<sub>m</sub></b>	0,008 ± 0,001
3'-T <sub>inv</sub> cgaaGGCCTL <sup>m</sup> GACACTagac	<b>FRS<sub>GC</sub>910<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	0,008 ± 0,001
3'-T <sub>inv</sub> AAGGCCTCGALACTAGACTCC	<b>FRS<sub>GU</sub>1010</b>	0,007 ± 0,002
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGALACTAgacu	<b>FRS<sub>GU</sub>98<sub>m</sub></b>	0,011 ± 0,001
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGAL <sup>m</sup> ACTAgacu	<b>FRS<sub>GU</sub>98<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	0,018 ± 0,005
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGALACTAGacuc	<b>FRS<sub>GU</sub>99<sub>m</sub></b>	0,030 ± 0,005
3'-T <sub>inv</sub> aggcCTCGAL <sup>m</sup> ACTAGacuc	<b>FRS<sub>GU</sub>99<sub>m</sub>L<sup>m</sup></b>	0,040 ± 0,006

Примечание. 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С; 0,02 мкМ РНК-транскрипт, 1 мкМ ДНКзим.





**Рис. 6.** «Мультикомпонентные» модифицированные ДНКзимы для расщепления IGF I мРНК. L<sup>m</sup> – последовательность модифицированного каталитического кора 5'GgCTAGcuACaCgga; n – 2'-O-метилрибонуклеотид, N – дезоксирибонуклеотид; N – рибонуклеотид.

**Таблица 7**

Эффективность расщепления 364-звенного транскрипта IGF I мРНК мультикомпонентными ДНКзимами

Серия	Конструкция	k <sub>obs</sub> , мин <sup>-1</sup>	Серия	Конструкция	k <sub>obs</sub> , мин <sup>-1</sup>
GAEL	ДНКзим	0,012 ± 0,001	FRS	ДНКзим	0,009 ± 0,002
	ДНКзим·F3'	0,056 ± 0,009		ДНКзим·F3'	0,017 ± 0,002
	ДНКзим·F5'	0,035 ± 0,002		ДНКзим·F5'	0,097 ± 0,018
	ДНКзим·F3'·F5'	0,081 ± 0,009		ДНКзим·F3'·F5'	0,117 ± 0,022

Примечание. 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 37 °С; концентрации РНК-транскрипта, ДНКзима и эффикторов (F3', F5') в реакционной смеси составляли 20, 200 и 100 нМ соответственно.

нию с системой ДНКзим•F3'. Эффективность расщепления транскрипта в случае одновременного присутствия эффекторов F3' и F5' совпадает с эффективностью расщепления системой ДНКзим•F5'. В случае же конструкций GAEL серии мы наблюдали несколько иной характер зависимости. Можно сказать, что максимальной скоростью гидролиза обладает система типа ДНКзим•F3'•F5', в то время как раздельное использование эффекторов одинаково сказывалось на эффективности расщепления РНК. Изучение кинетических и термодинамических аспектов реакции расщепления протяженного фрагмента РНК мультикомпонентными ДНКзимными системами является предметом наших дальнейших исследований.

Результаты, полученные в ходе данных исследований, подтверждают правильность выбранной нами стратегии конструирования мультикомпонентных ДНКзимов, основанной на применении 3'-модифицированных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов)-эффекторов, стабильных в биологических средах и способных к «разворачиванию» сложной пространственной структуры РНК в участке связывания ДНКзима, и позволяют рассматривать созданные нами ДНКзимные конструкции перспективными инструментами для подавления экспрессии генов.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 05-04-48341), INTAS (№ 03-51-5281), FEBS, ФЦНТП РИ-012/001/254, РИ-111.0/002/097 и грантом СО РАН в поддержку молодых ученых.

### Литература

Веняминова А.Г., Кузнецова М.А., Фокина А.А. Бинарные НК-энзимы // Вестник научно-образовательных центров. 2004. № 5/6. С. 14–18.

Кузнецова М.А., Репкова М.Н., Фокина А.А. и др. «10–23» ДНКзимы для направленного расщепления мРНК гена *mdr1* // Изв. РАН. Сер. хим. 2002. Т. 51. № 7. С. 1100–1103.

Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Биохимия. 2000. Т. 65. № 1. С. 112–126.

Amarzguioui M., Prydz H. Hammerhead ribozyme design and application // Cell Mol. Life Sci. 1998. V. 54. № 11. P. 1175–1202.

Cairns M.J., King A., Sun L.Q. Optimization of the 10–23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine sites // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. № 11. P. 2883–2889.

Fokina A., Francois J.-C., Venyaminova A. 10–23 DNA enzymes for targeting IGF I mRNA // All-Russian conference «Fundamental science to medicine». Novosibirsk. September 4–8, 2005. Abstracts. P. 114.

Fokina A.A., Kuznetsova M.A., Repkova M.N., Venyaminova A.G. Two-component 10-23 DNA enzymes // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. V. 23. № 6/7. P. 1031–1035.

Horn S., Schwenzer B. Oligonucleotide facilitators enhance the catalytic activity of RNA-cleaving DNA enzymes // Antisense Nucl. Acids Drug Dev. 1999. V. 9. № 5. P. 465–472.

Hovig E., Maeldandsmo G., Mellingsaeter T., et al. Optimization of hammerhead ribozymes for the cleavage of S100A4 (CAPL) mRNA // Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 2001. V. 11. № 2. P. 67–75.

Joyce G.F. RNA cleavage by the 10–23 DNA enzyme // Methods Enzymol. 2001. V. 341. P. 503–517.

Kostenko E.V., Beabealashvilly R.S., Vlassov V.V., Zencova M.A. Secondary structure of the 5'-region of PGY1/MDR1 mRNA // FEBS Lett. 2000. V. 475. № 3. P. 181–186.

Kovalev N., Zenkov A., Kuznetsova M., et al. Efficient cleavage of MDR1 RNA with 10-23 DNAzymes // Intern. conf. «Targeting RNA: artificial ribonucleases, conformational traps and RNA interference». Novosibirsk, June 18–21, 2003. P. 55.

Kuznetsova M., Fokina A., Lukin M. et al. Catalytic DNA and RNA for targeting MDR1 mRNA // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2003. V. 22. № 5/8. P. 1521–1523.

Novopashina D., Kuznetsova M., Venyaminova A. 2'-O-Modified oligoribonucleotides with terminal 3'-3'-internucleotide linkage and their derivatives // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2001. V. 20. № 4/7. P. 903–907.

Pollak M.N., Schernhammer E.S., Hankinson S.E. Insulin-like growth factors and neoplasia // Nat. Rev. Cancer. 2004. V. 4. № 7. P. 505–518.

Ramalho Ortigao J.F., Rosch H., Selter H. et al. Antisense effect of oligodeoxynucleotides with inverted terminal internucleotidic linkages: a minimal modification protecting against nucleolytic degradation // Antisense Res. Dev. 1992. V. 2. № 2. P. 129–146.

Santoro S.W., Joyce G.F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. № 9. P. 4262–4266.

Schubert S., Gul D.C., Grunert H.P. et al. RNA cleaving

10-23 DNazymes with enhanced stability and activity // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. № 11. P. 5982–5992.

Silverman S.K. *In vitro* selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 19. P. 6151–6163.

## TWO-COMPONENT 10–23 DNazymes

**A.A. Fokina, A.N. Zenkov, M.A. Zenkova, A.G. Venyaminova,  
J.-C. François, V.V. Vlassov**

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: ven@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Department of regulation, development and molecular variability at National museum  
of Natural History, Paris 05, France

### Summary

DNazymes represent a new class of catalytic nucleic acids capable of site-specific cleavage of RNA.

To regulate the catalytic activity of DNzyme targeting to MDR1 and IGF I mRNA we suggested an approach based on the combination of the 10-23 DNzyme with 3'-modified oligo(2'-O-methylribonucleotides) on the assumption that they would be more favorable as effectors due to their high affinity to RNA and nuclease resistance. It was shown that designed DNzyme constructions were able to cleave effectively short synthetic mRNA fragments as well as long structured RNA transcripts under simulated physiological conditions.