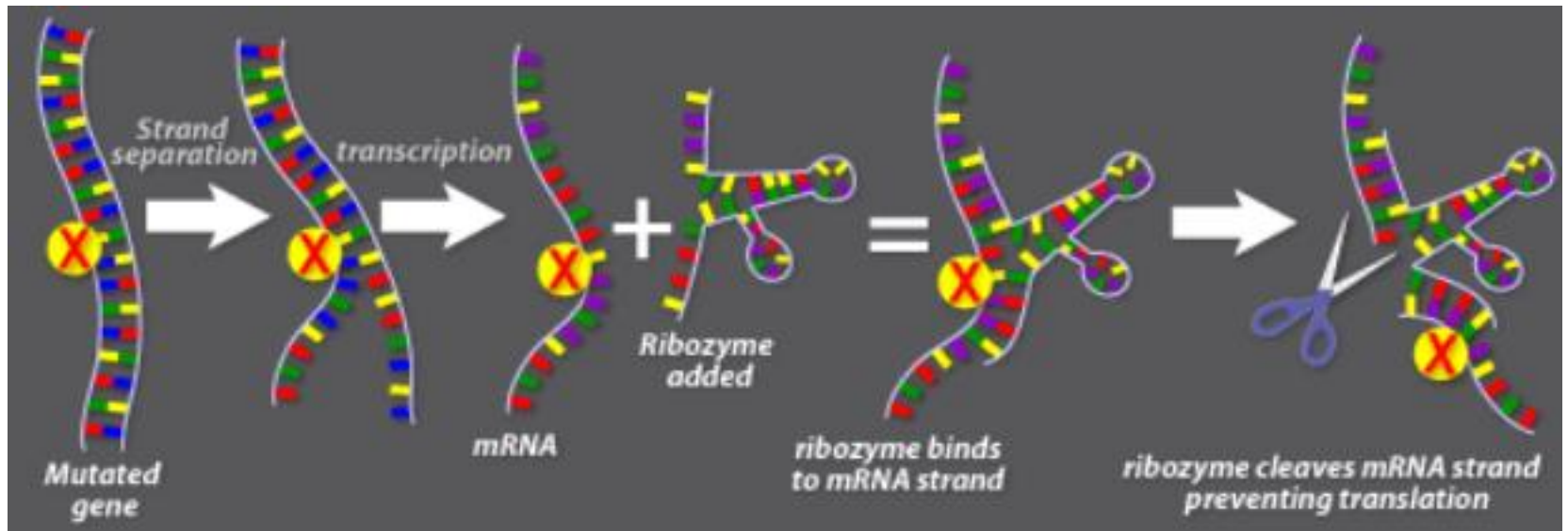


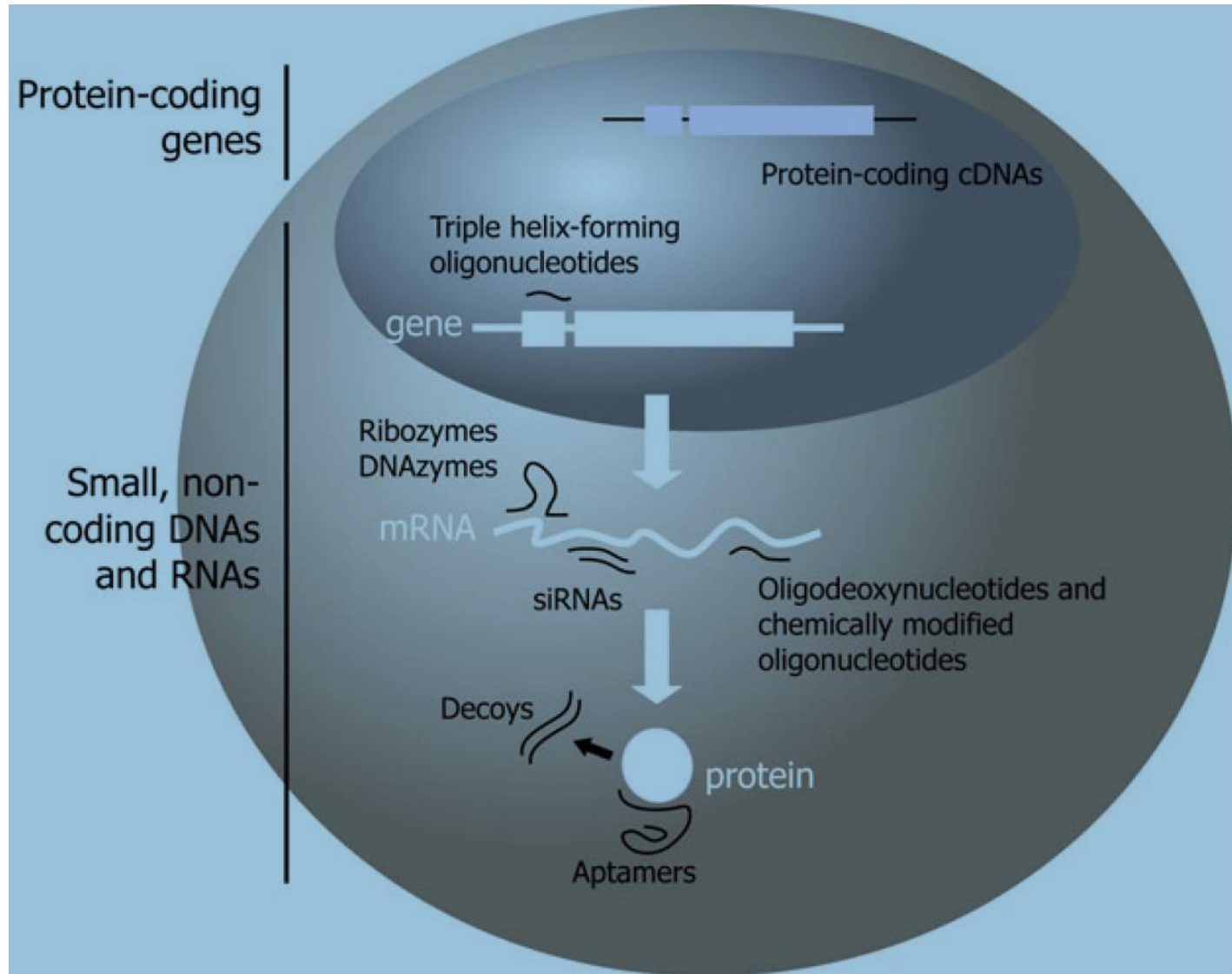
Основы генной инженерии и биотехнологии



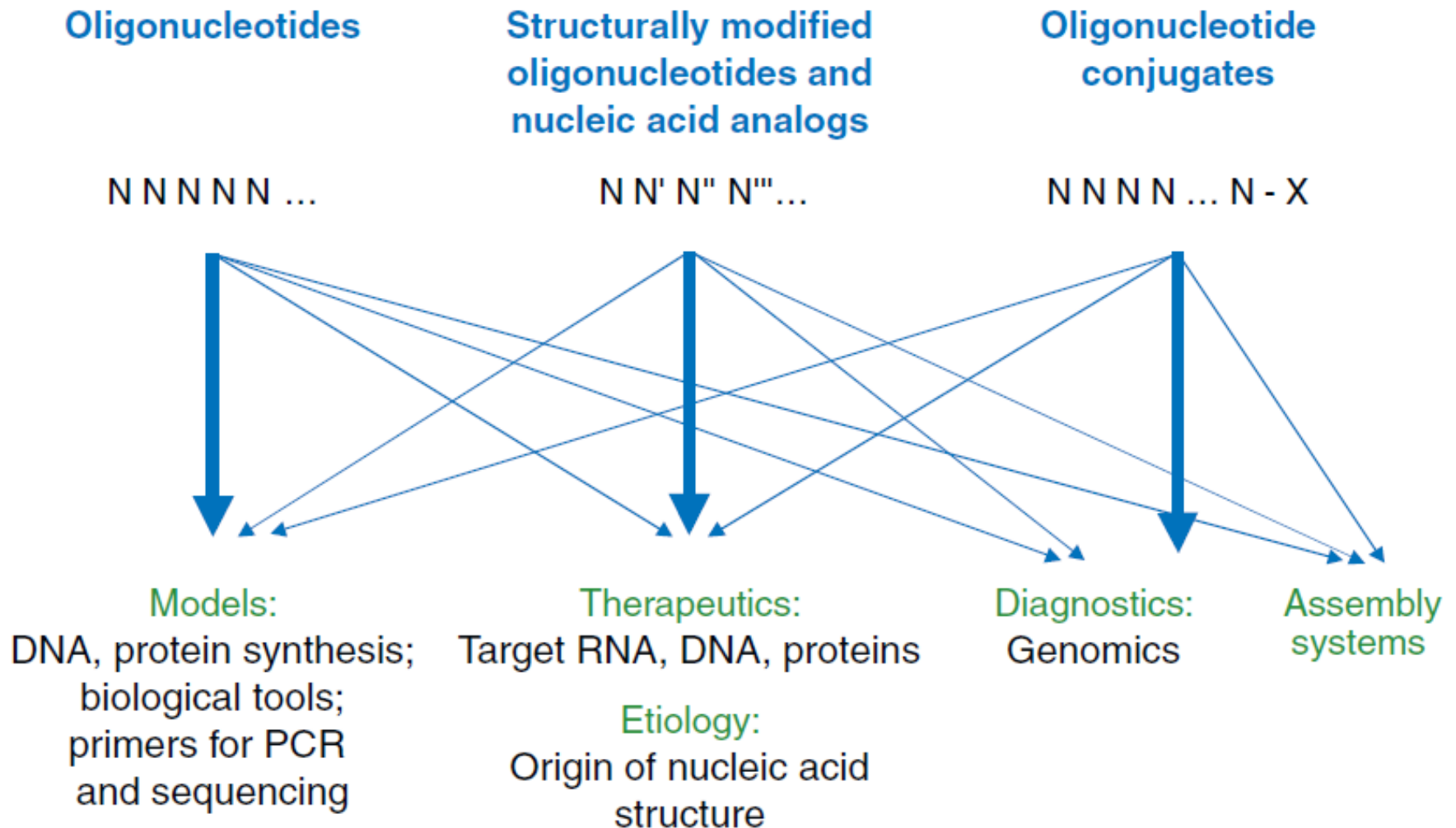
Лекция 5

Технологии антисмысловых последовательностей
Нуклеиновые кислоты как ферменты

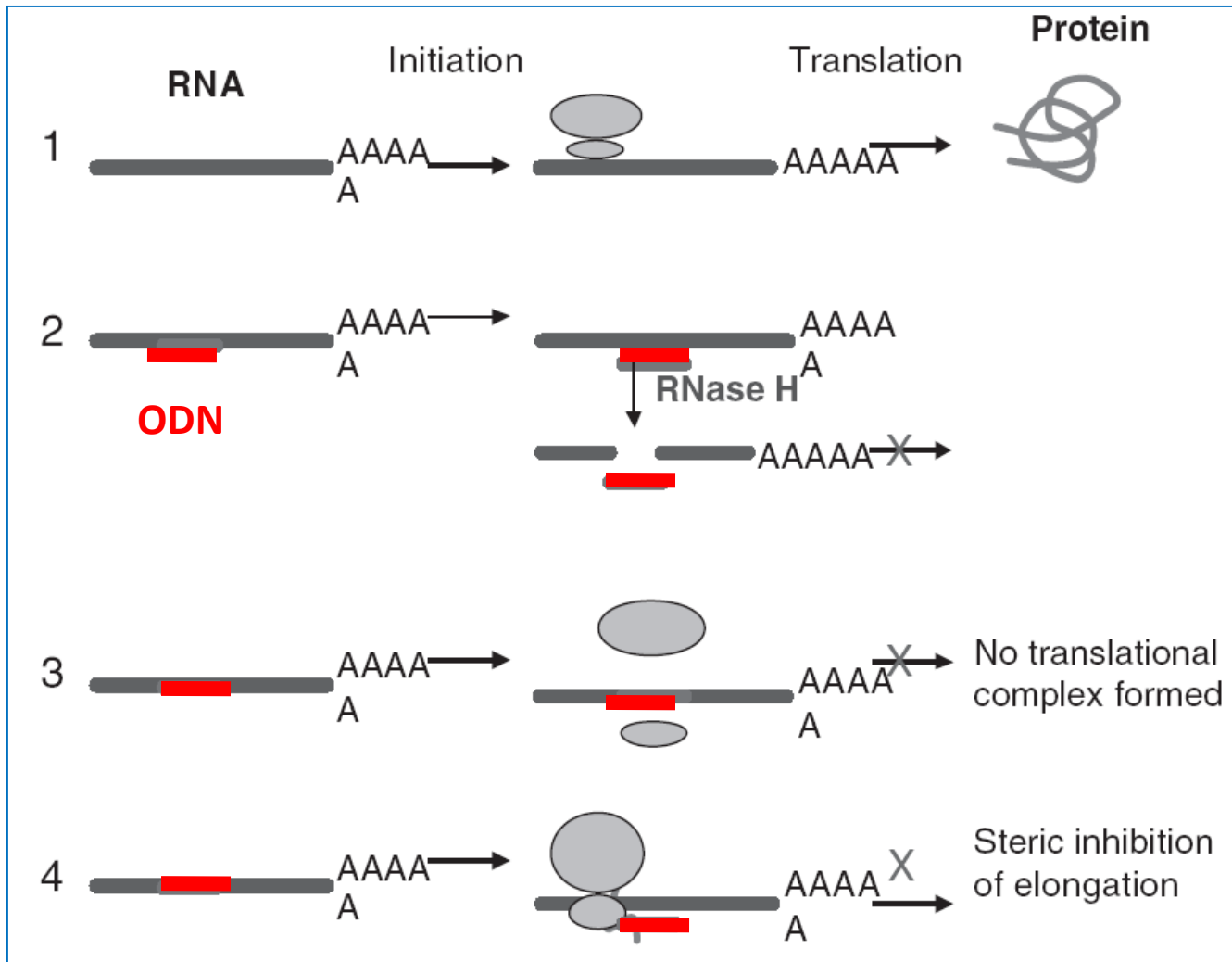
Использование нуклеиновых кислот для изменения экспрессии генов в эукариотических клетках



Сферы применения синтетических олигонуклеотидов



Механизмы подавления трансляции антисмысловыми олигонуклеотидами (ODN)



Трансляция в
норме

Разрушение РНК
РНКазой Н

Блок инициации

Блок элонгации

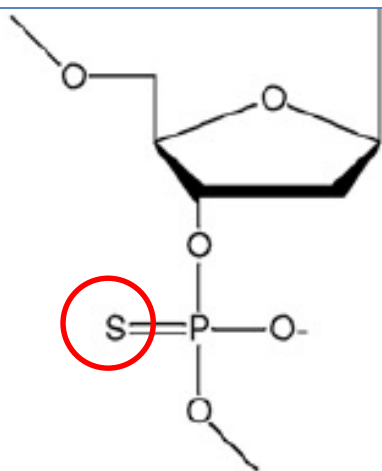
ODN первого поколения

ISIS 2302 20-звенная молекула, завершены клинические испытания при язвенных колитах, мишень - ICAM-1 mRNA, аппликация через клизму, остановка кровотечений, восстановление слизистой

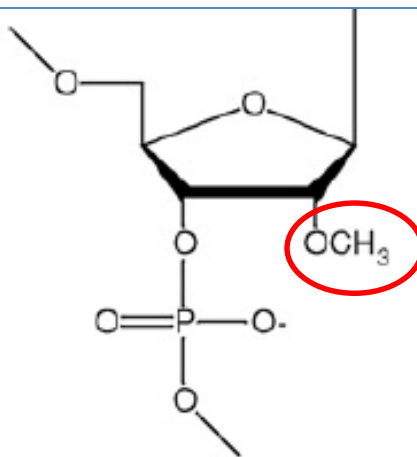
fomivirsen – 1998 – против цитомегаловирусов

ODN второго поколения: гапмеры (gapmer)

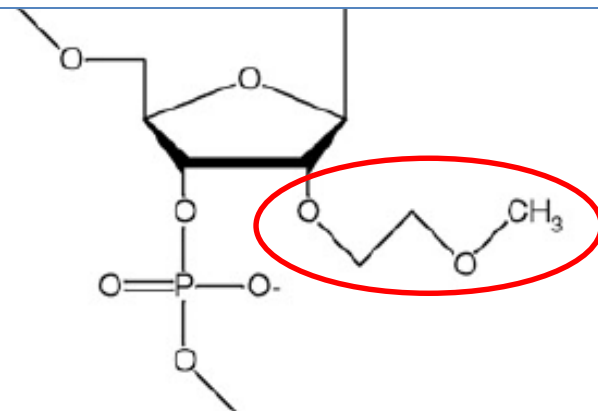
По всей длине фосфотиоатные связи, на 3'- и 5'-концах 2'-модифицированные нуклеотиды



phosphorothioate



2'-O-methyl

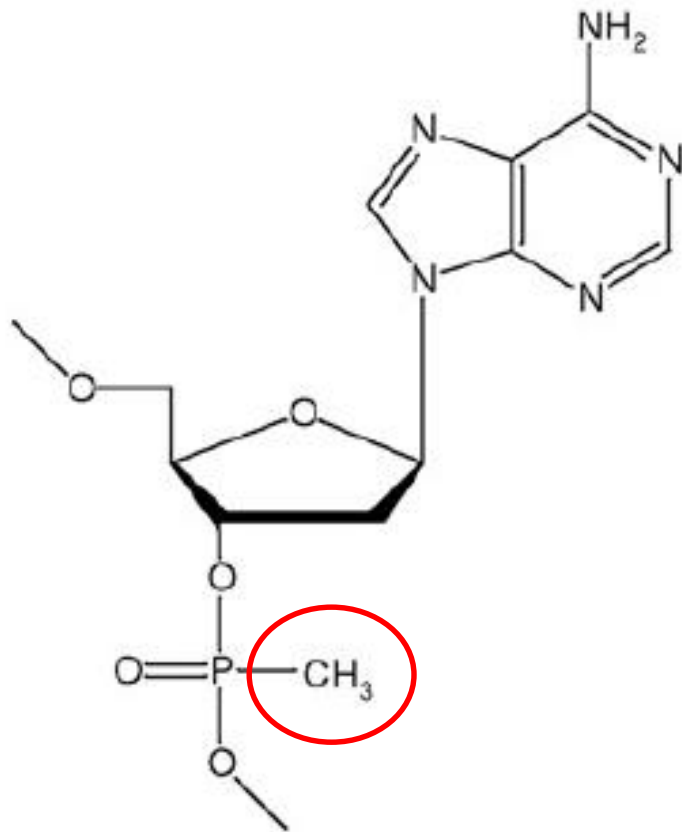


2'-O-methoxyethyl

Свойства антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов (ODN)

- ❖ Механизм проникновения в клетку напоминает эндоцитоз, опосредованный рецепторами
- ❖ Высокие действующие концентрации
- ❖ Низкая внутриклеточная стабильность (время полужизни в ооцитах ~20 мин.
- ❖ Отсутствие иммунного ответа
- ❖ гапмеры (garmer) – ODN, построенные из аналогов нуклеотидов, сохраняющие в центральной части чувствительность к РНКазе H за счет блока дезоксирибонуклеотидных мономеров.

Метилфосфонатные производные ODN

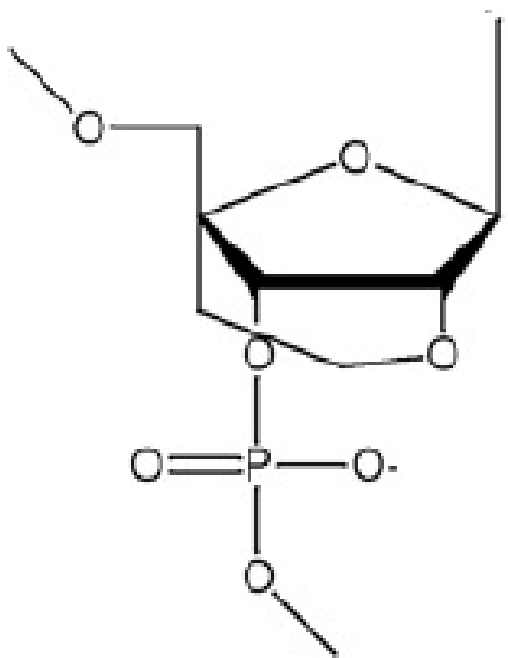


Methyl phosphonate

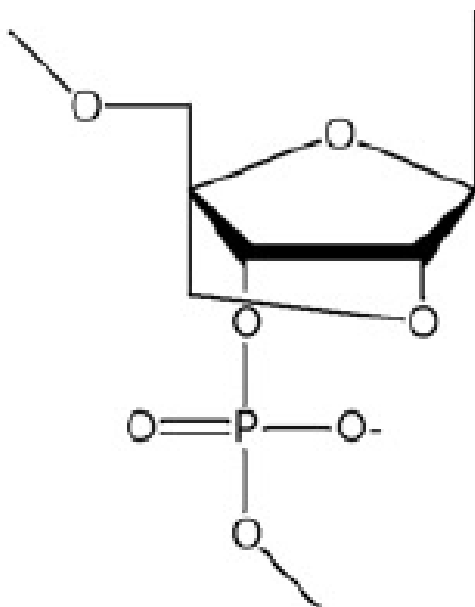
Метилфосфонатные аналоги не расщепляются РНКазой Н

Чередование фосфодиэфирных и метилфосфонатных связей повышает стабильность и восстанавливает чувствительность РНК к РНКазе Н

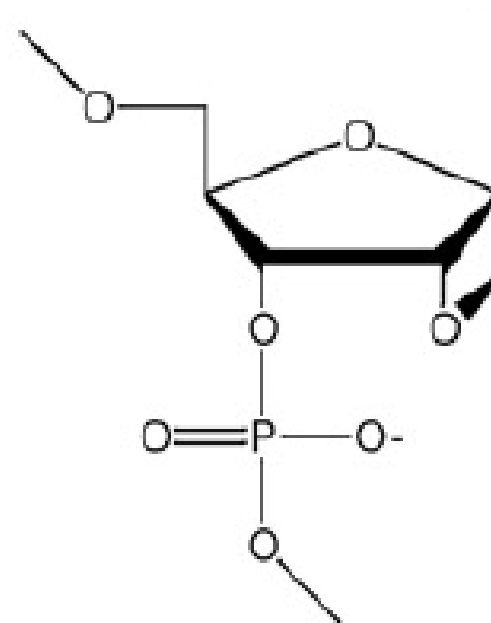
Модификации на основе бициклических сахаров



ENA - ethylene-bridged nucleic acid



LNA - locked nucleic acid



Oxetane-modified ribose

Фиксируют 3'-эндо- (вне плоскости рибозного кольца) конформацию сахара, усиливая термодинамическую стабильность ДНК-дуплексов

Нуклеиновые кислоты с этиленовым мостиком (ENA)

Использованы для коррекции альтернативного сплайсинга при мутации в гене дистрофина, приводящей к мышечной дистрофии Дюшенна

Оксетан-модифицированные ODN

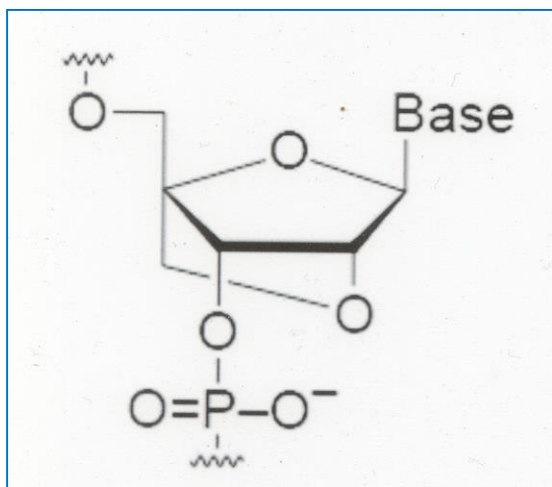
- ❖ Повышенная устойчивость к нуклеазам
- ❖ Повышенное сродство к мишени
- ❖ Высокая специфичность
- ❖ Не влияют на активность РНКазы H

Эффективно использовалась для понижения уровня экспрессии онкогена *c-myc*

Замкнутые нуклеиновые кислоты Locked Nucleic Acids (LNA)

LNA – олигонуклеотиды, содержащие один или несколько LNA-мономеров

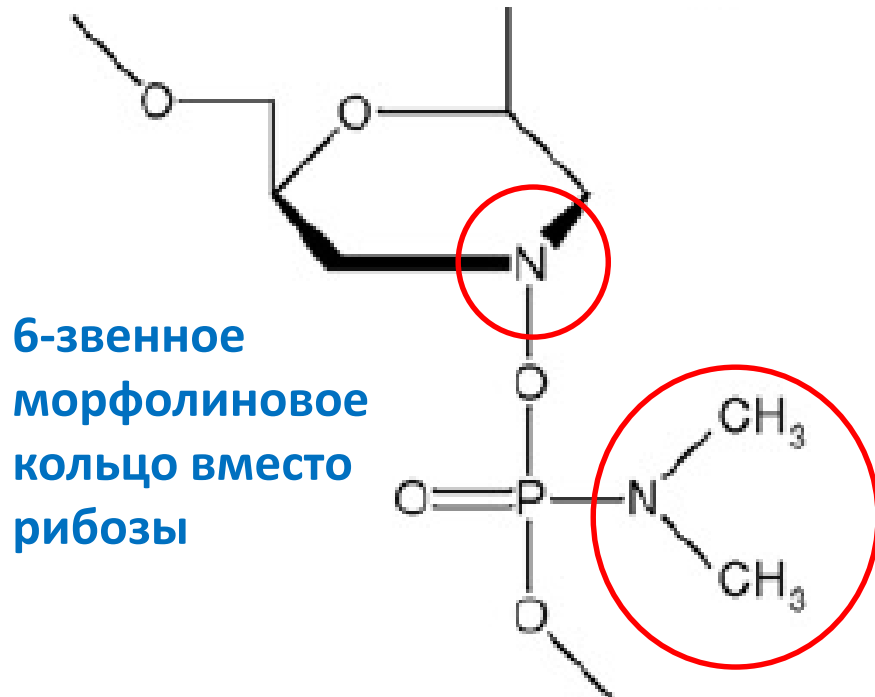
5'-(C^LUC^LCC^LAGGC^LUC^LA) – химерная молекула RNA/LNA активна против Tat-РНК вируса иммунодефицита человека (HIV-1)



LNA-мономер

- ❖ Очень высокое сродство к комплементарным ДНК и РНК
- ❖ LNA-зимы (LNAzymes) расщепляют РНК со сложной пространственной структурой
- ❖ Доза: 500 мкг/кг ежедневно для подавления отторжения трансплантата

Антисмысловые морфолино- (morpholino) ODN



Высокоустойчивы к нуклеазам

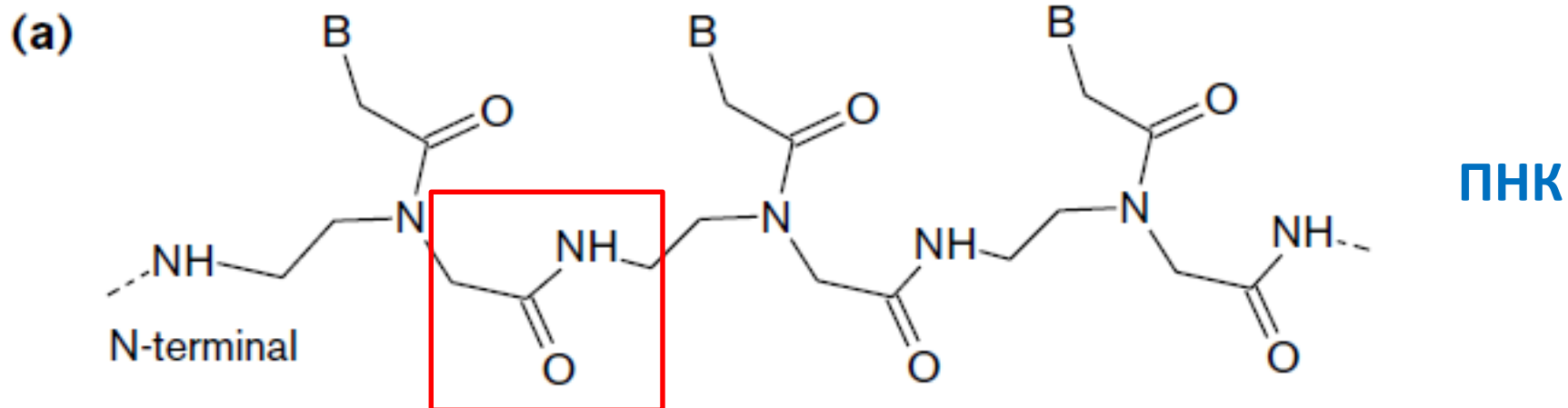
Высокоспецифичны

Эффективны в понижении экспрессии генов *in vivo*

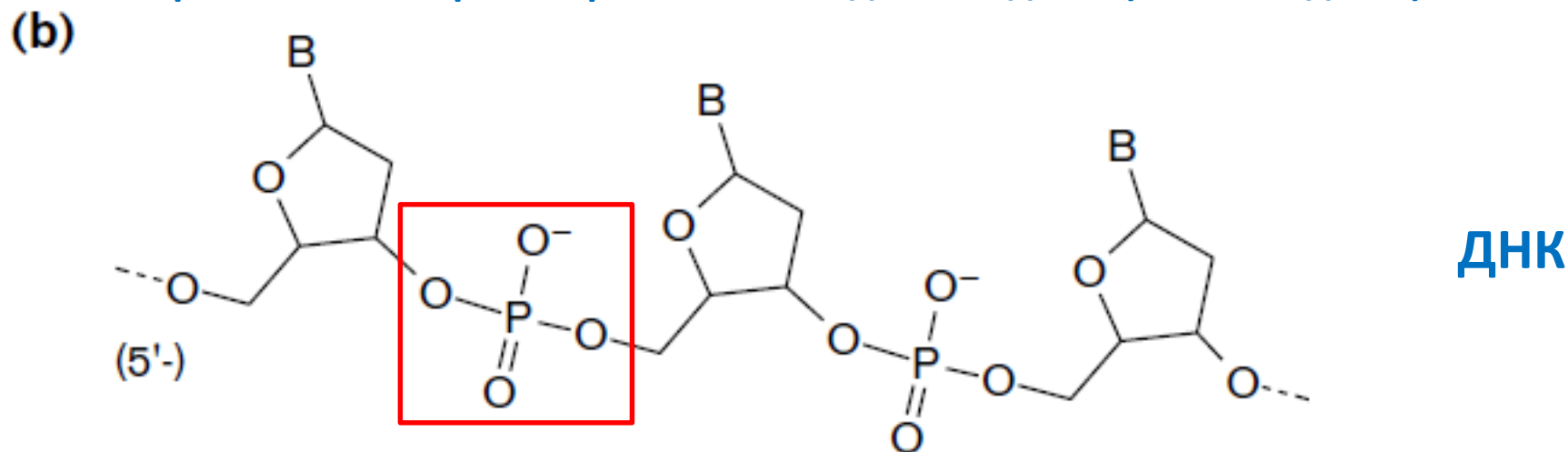
Использовались для исследования развития *Xenopus* и рыб путем прямой инъекции в эмбрионы для получения генных нокдаунов

Фосфородиамидитная связь вместо фосфодиэфирной связи
Электронейтральная молекула

Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) Peptide nucleic acids (PNAs)

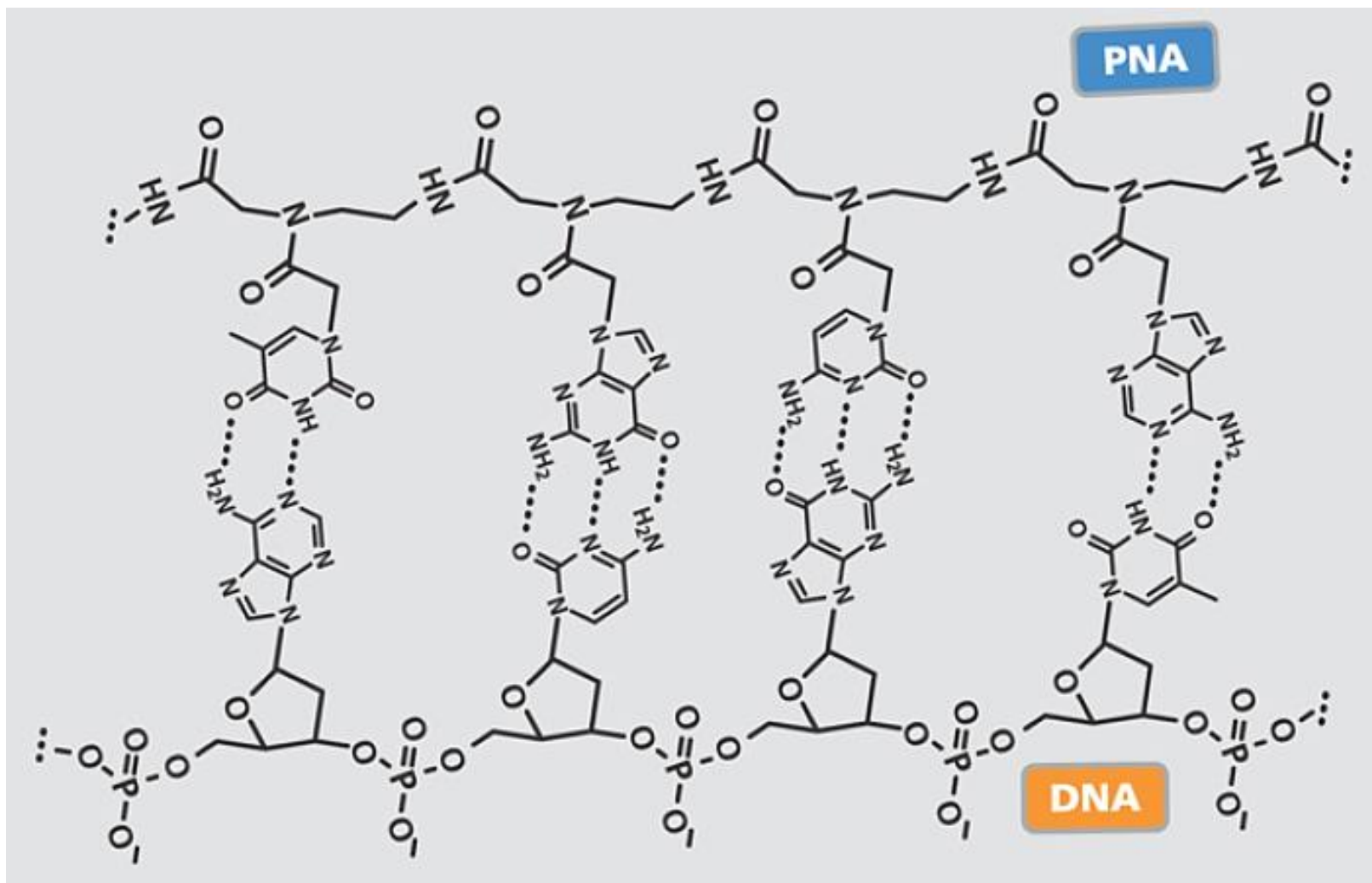


Ахиральный электронейтральный псевдопептидный (полиамидный) остов ПНК



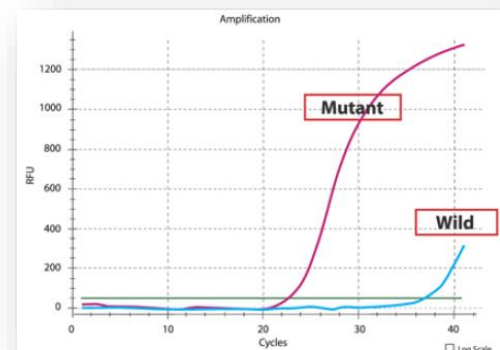
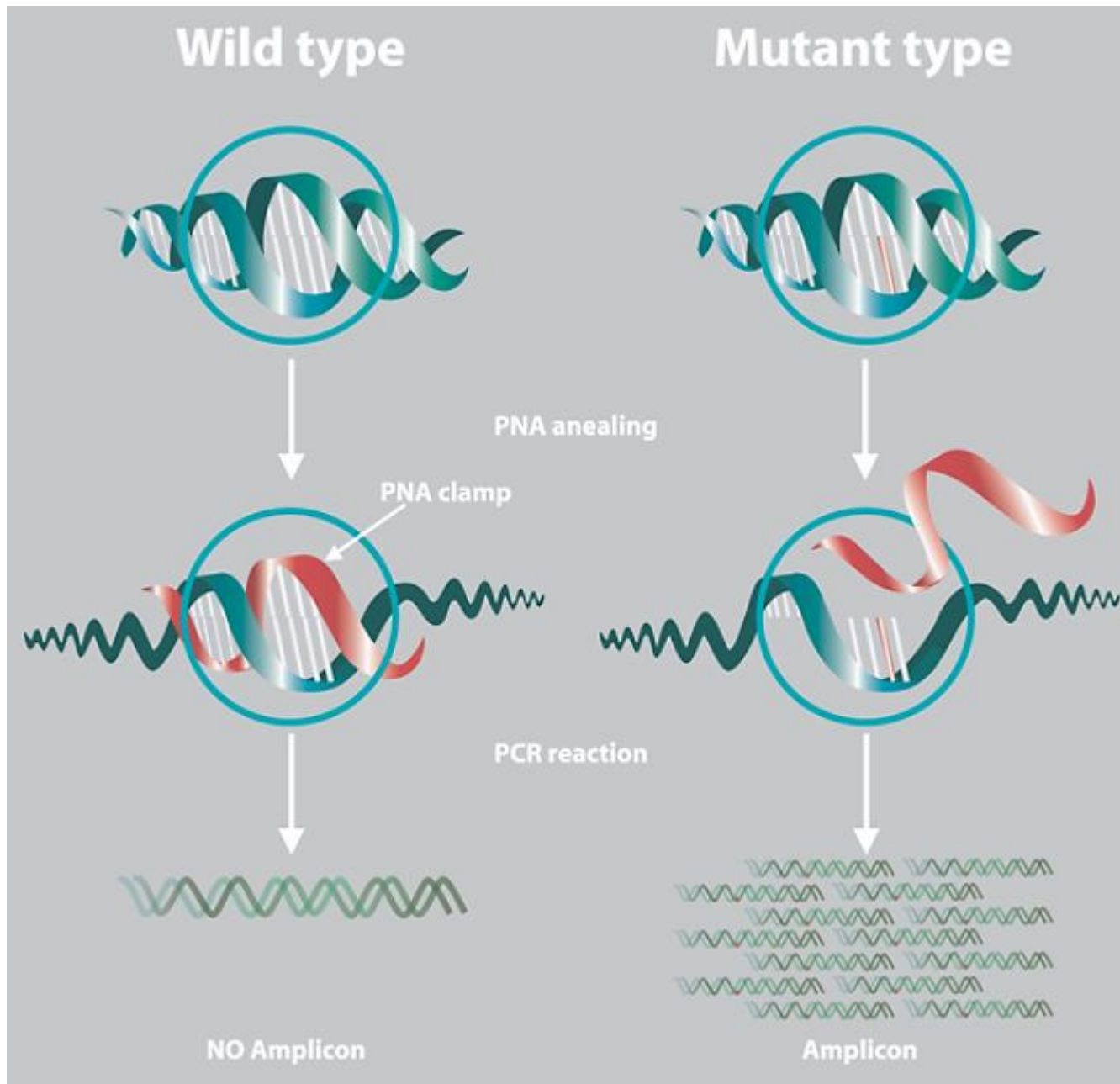
Сахаро-фосфатный остов ДНК, построенный на основе фосфодиэфирных связей

Комплементарные взаимодействия между ПНК и ДНК



Аллель-специфический ПНК-зажим

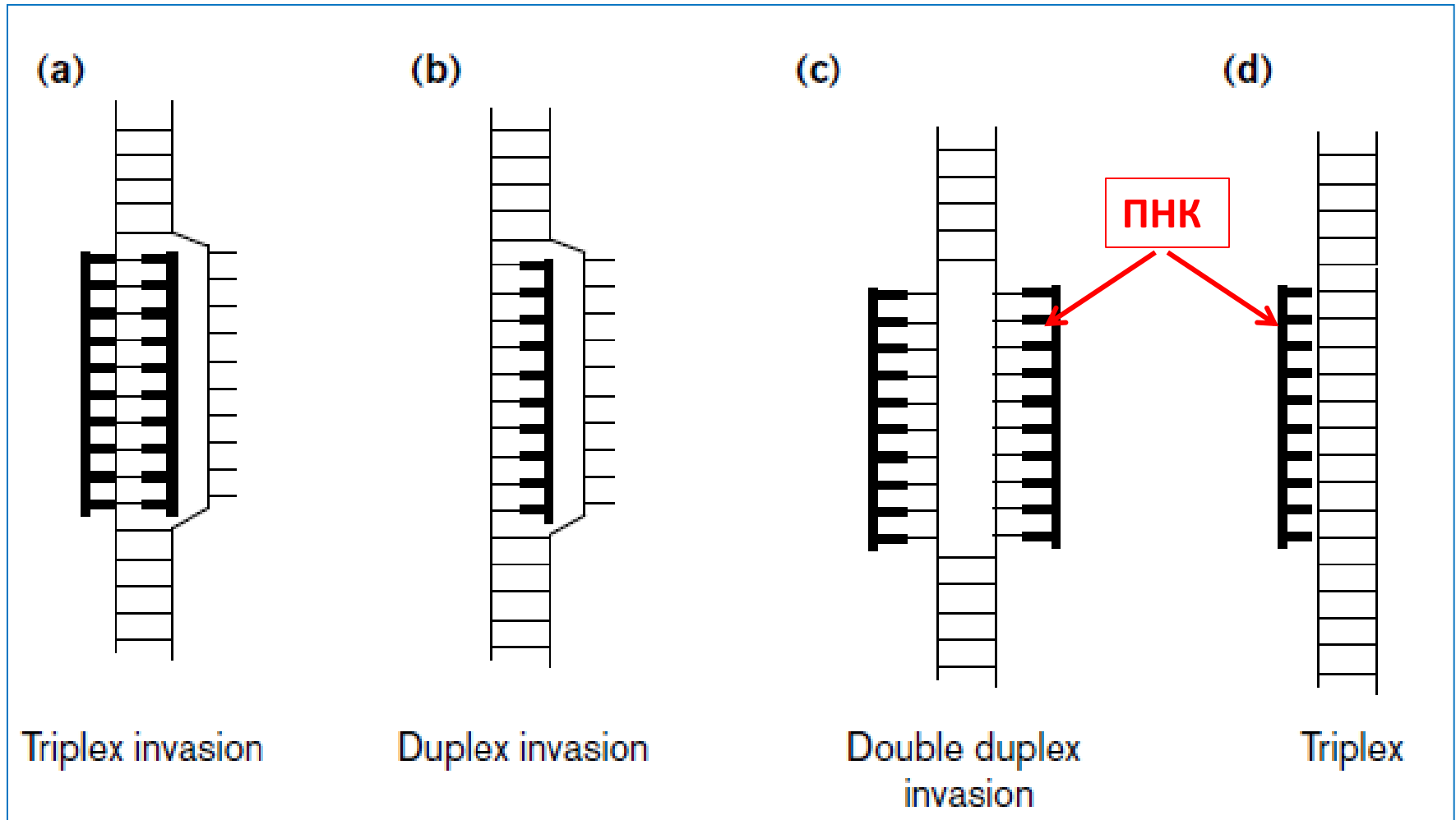
Лишь при полной комплементарности ПНК и ДНК образуется комплекс, который блокирует ПЦР в реальном времени



Свойства пептидо-нуклеиновых кислот

- ❖ Электронейтральность псевдопептидной цепи (особая прочность комплементарных взаимодействий в ПНК-ДНК- и РНК-комплексах)
- ❖ Низкая токсичность для клеток
- ❖ Устойчивость к нуклеазам и пептидазам
- ❖ Отсутствие неспецифических взаимодействий с белками цитоплазмы
- ❖ Введение в клетки стандартной трансфекцией

Комплексы, образуемые ПНК с двухцепочечной ДНК



ПНК: Гомопиримидиновая Гомопуриновая Нестандартные нуклеотиды С-богатая

Применение пептидо-нуклеиновых кислот

❖ Антисмысловые и анти-генные стратегии

мишени – мРНК (AUG-кодона) и dsДНК (триплексы),
антимикробные агенты (мишень – 23S РНК)

❖ Доставка лекарств и радиоизотопов к генам

❖ Гибридизация с нуклеиновыми кислотами

Не могут быть праймерами в ПЦР, флуоресцентно-меченые зонды
для гибридизации *in situ*, MALDI-TOF масс-спектрометрия, биочипы
на основе ПНК

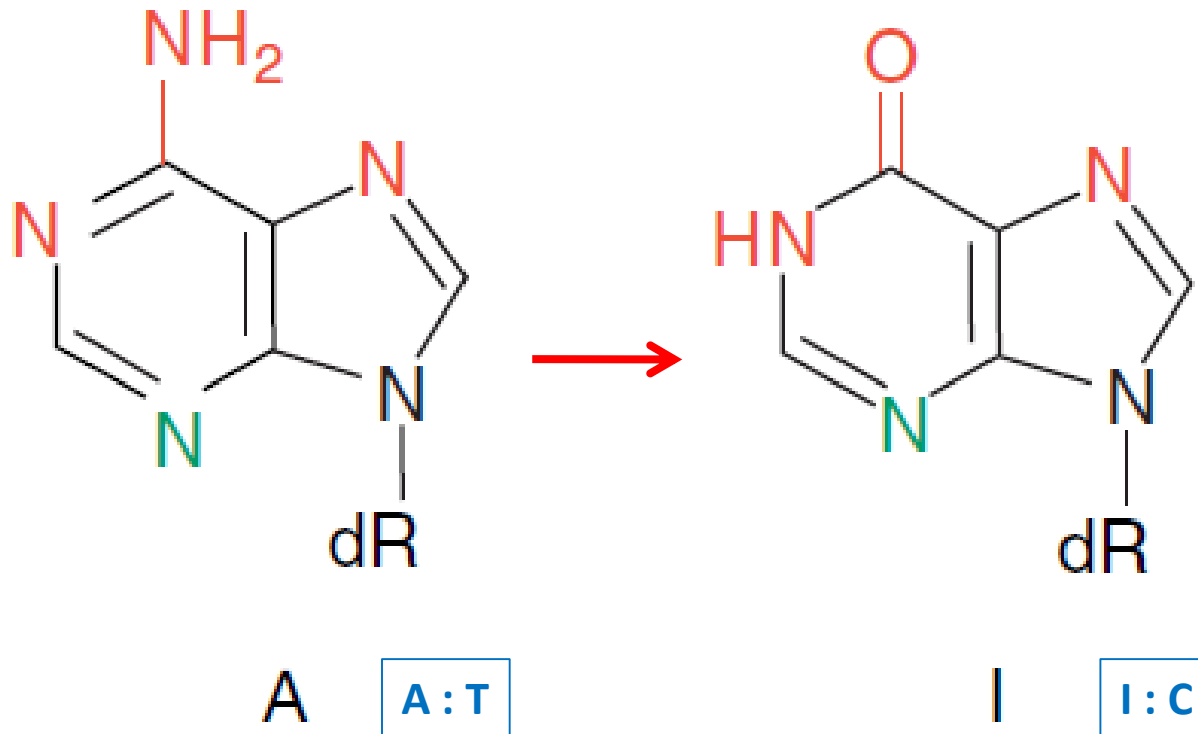
❖ Аффинное выделение нуклеиновых кислот

Сравнение свойств ПНК, LNA и 2'-ОМе при использовании в качестве ингибиторов miРНК

Criteria	PNAs™ miRNA inhibitor	LNA	2'-OMe
Efficiency of miRNA inhibition	+++++	+++	+
Specificity for target miRNA	+++++	+++	++
Stability to nuclease degradation	+++++	++	+
Toxicity for cells	-	+	-
Storage	4°C (Long-lasting)	-20°C	-20°C

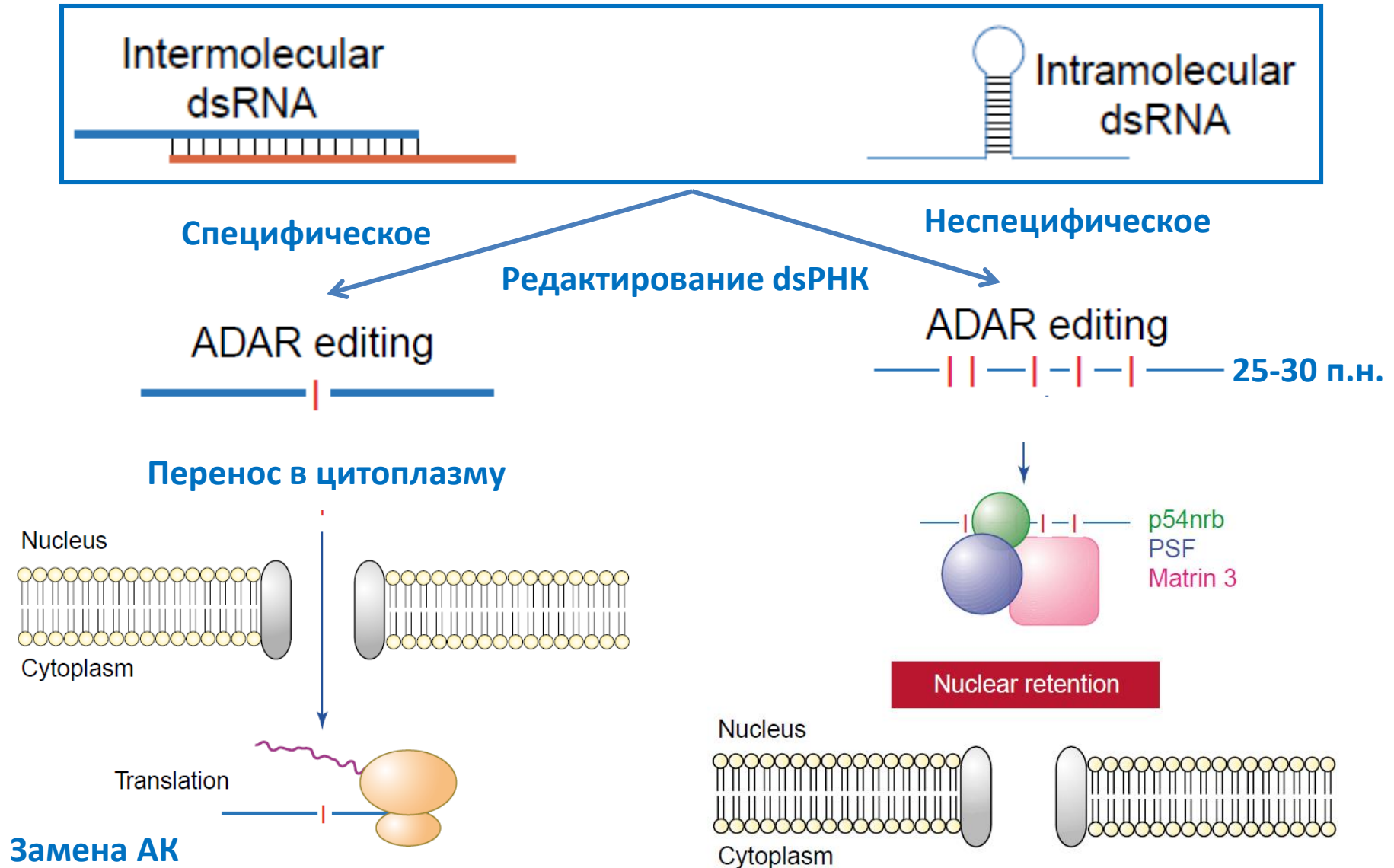
LNA – замкнутые нуклеиновые кислоты
2'-ОМе – 2'-О-метильная модификация

Гидролитическое дезаминирование аденозина с образованием инозина аденозиндеаминазой ADAR (Adenosine Deaminase that Acts on RNA)

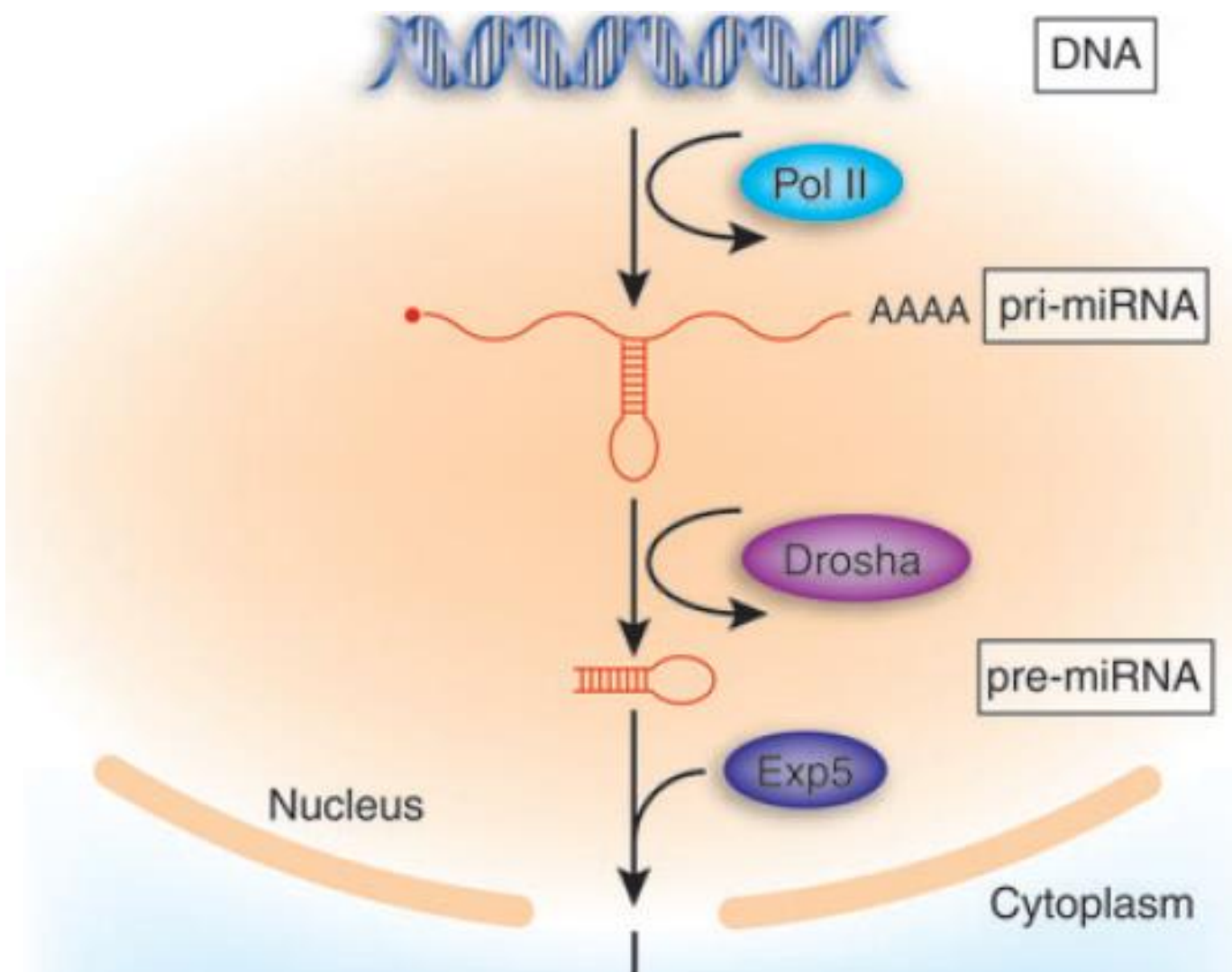


Инозин в мРНК распознается системой трансляции как **гуанозин** и его введение в мРНК сопровождается миссенс- (но не нонсенс-) мутациями

Метаболизм dsРНК с участием аденозиндезаминазы ADAR



Биогенез микроРНК (miRNA) в клетках животных - ядро



Более 3000 генов
miRNA у человека

Pol II – RNA
polymerase II

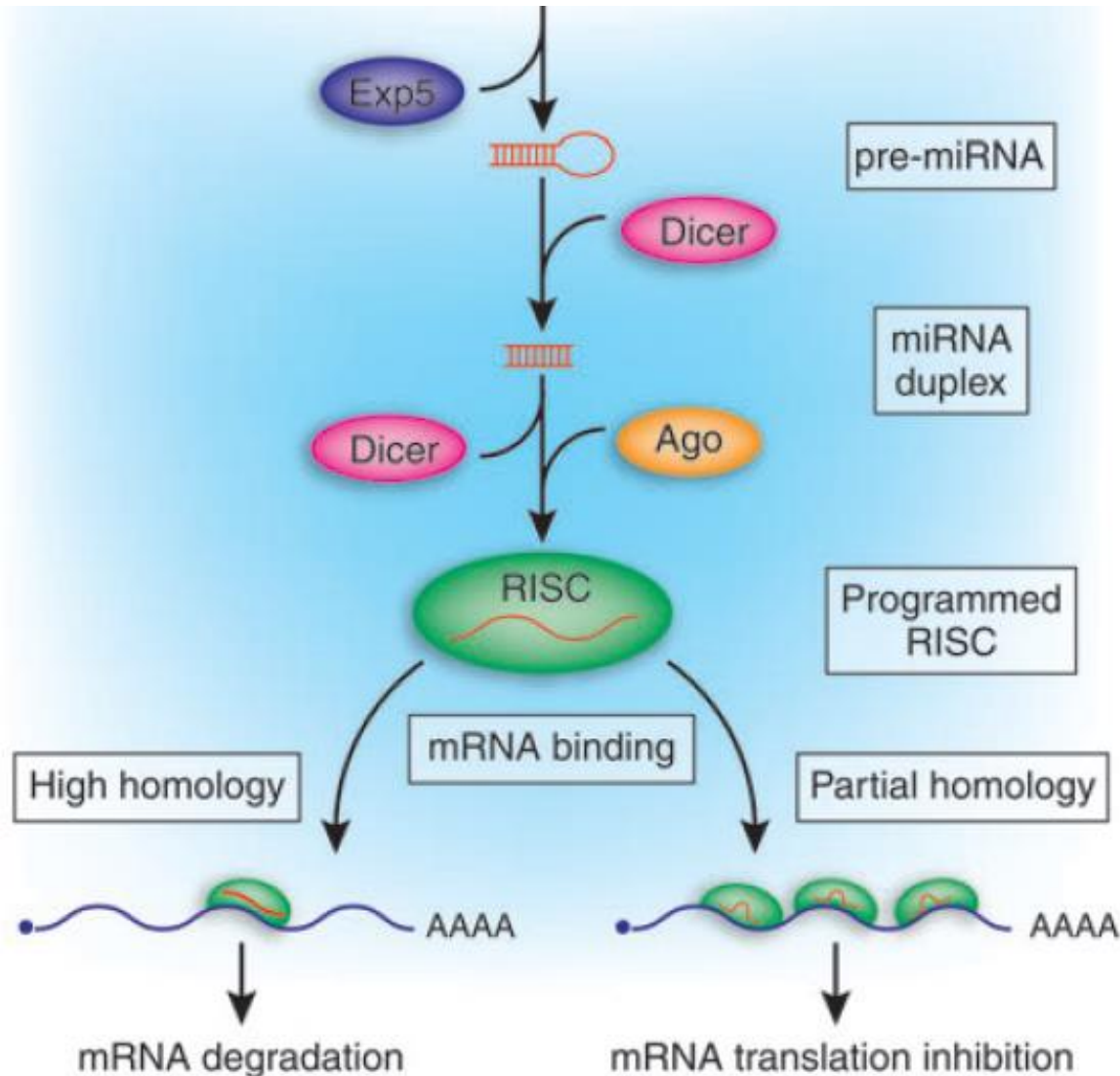
pri-miRNA –
primary miRNA
(200-2000 nt)

Drosha – RNase III

pre-miRNA (60 nt)

Exp5 – Exportin 5

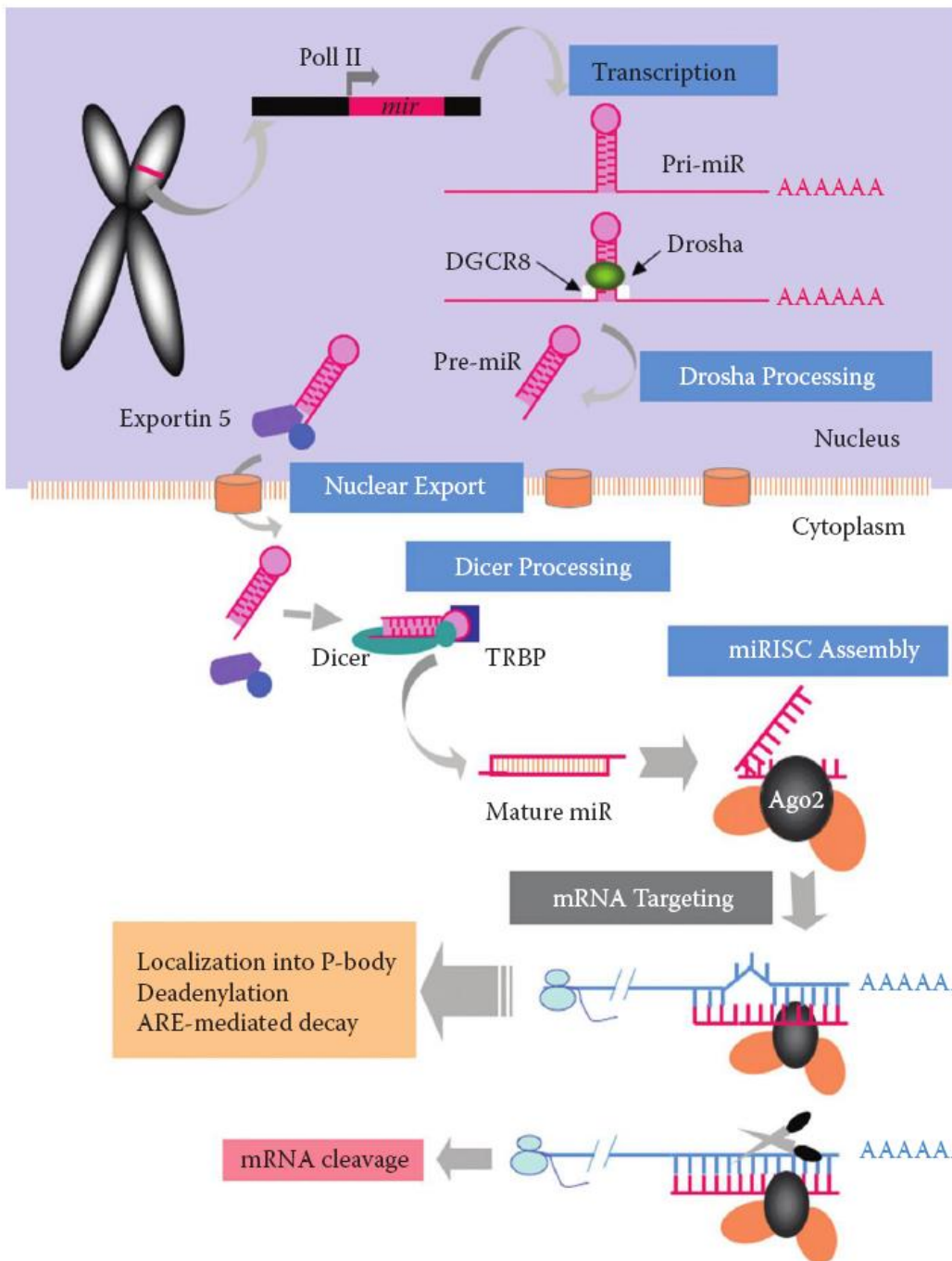
Биогенез микроРНК в клетках животных - цитоплазма



Dicer – вторая РНКаза III

RISC – RNA induced silencing complex

При полной комплементарности miRNA и мРНК – деградация мРНК, при частичной – подавление трансляции



Механизм действия miРНК у животных

DGCR8 – РНК-связывающий белок

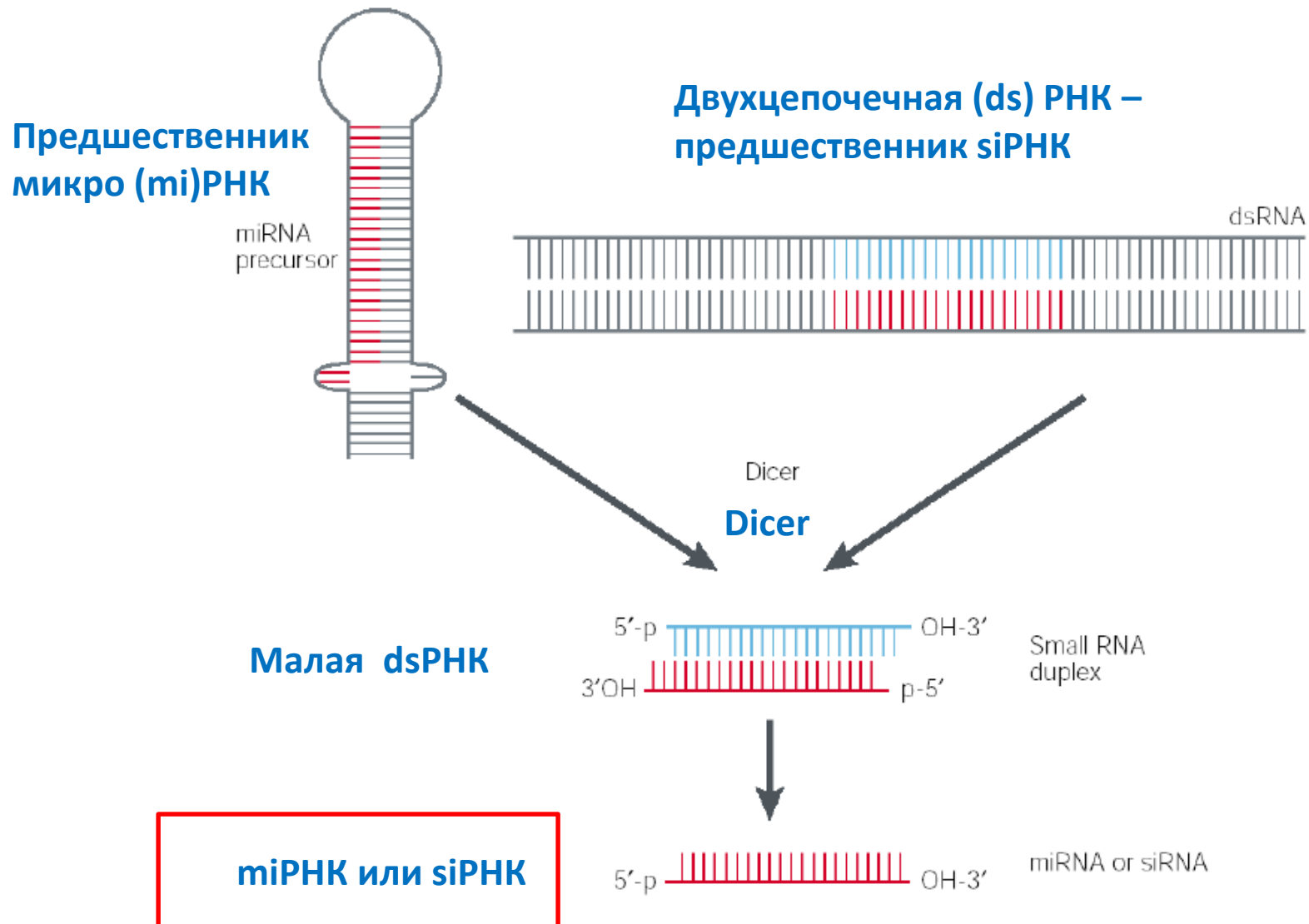
TRBP - HIV-1 TAR RNA Binding Protein

Сборка miRISC-комплекса

Частичная комплементарность miРНК
P-bodies - processing bodies -
 декэпирование, деградация, а также
 временное хранение мРНК

Полная комплементарность miРНК

Микро-РНК (miRNA) и короткие интерферирующие РНК (siRNA) могут использовать один и тот же механизм для осуществления сайленсинга генов



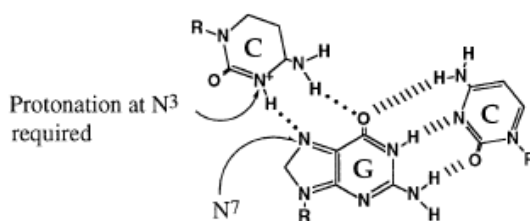
Механизм образования тройных спиралей ДНК триплекс-формирующими олигонуклеотидами (ТФО)



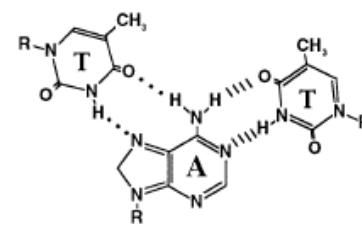
B



Triplex-forming oligonucleotide
Polypurine strand of DNA
Polypyrimidine strand of DNA

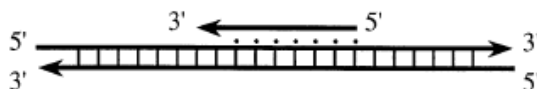


C⁺·G·C

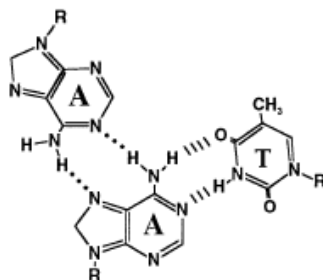


T·A·T

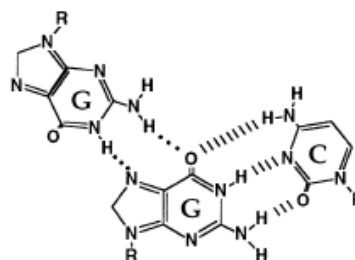
C



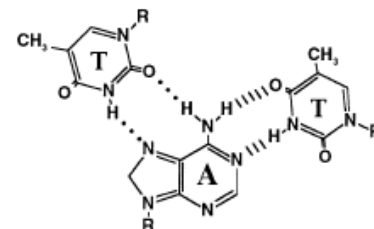
Triplex-forming oligonucleotide
Polypurine strand of DNA
Polypyrimidine strand of DNA



A·A·T



G·G·C



T·A·T

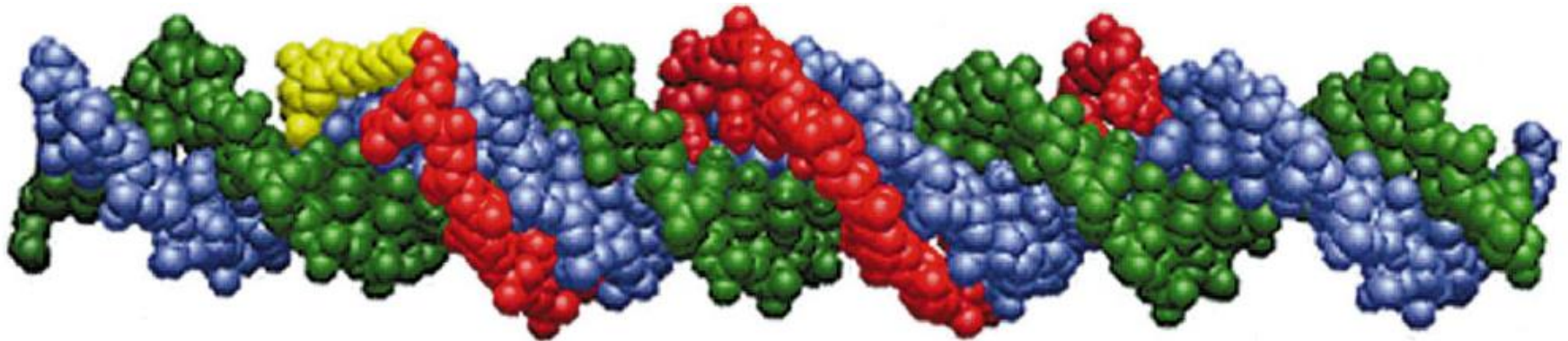
**Хугстиновские
связи**

Трехмерная модель трехцепочечного участка ДНК, образованного триплекс-формирующим олигонуклеотидом (ТФО)

Молекула
псоралена

Цепь, обогащенная
пуринами

Цепь, обогащенная
пиримидинами



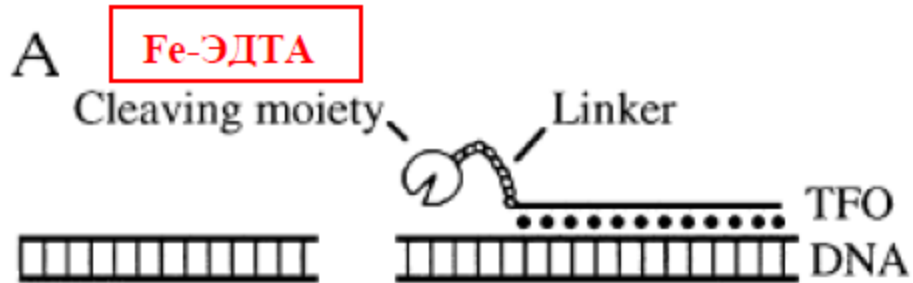
ТФО
5'→3'

Условия образования и свойства TFO

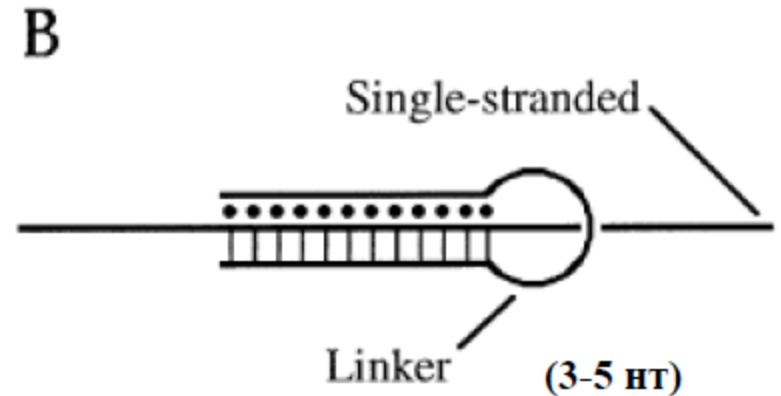
- ❖ Взаимодействуют с гомопуриновой цепью ДНК по большой бороздке
- ❖ Могут содержать в себе как пуриновый, так и пиримидиновый мотивы
- ❖ У пиримидиновых TFO в парах $C \cdot G : C$ остаток C должен быть протонирован по $N3$ (что происходит только при низких значениях pH)
- ❖ Пуриновые TFO, а именно: $A \cdot A : T$, $G \cdot G : C$ и $T \cdot A : T$, образуются независимо от pH окружающей среды
- ❖ Для TFO характерна высокая специфичность: 16-звенный TFO взаимодействует с одним уникальным сайтом на 10⁹ т.о.
- ❖ TFO стабилизируются ионами Mg^{2+} , Ca^{2+} и полиаминами

Использование триплекс-образующих нуклеотидов в молекулярной генетике

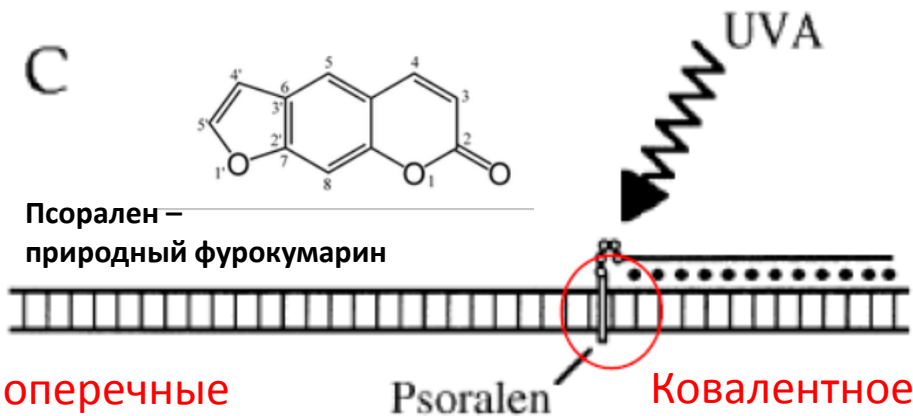
«Молекулярные ножницы»



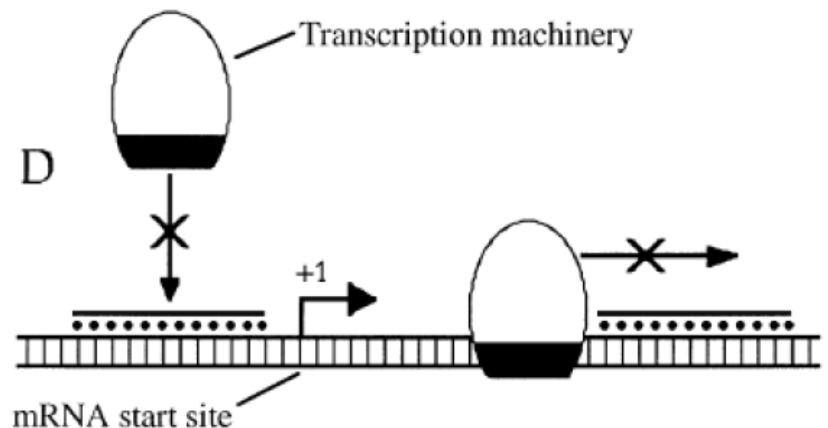
Олигонуклеотидный зажим



Направленный мутагенез



Подавление транскрипции



Поперечные
сшивки цепей ДНК

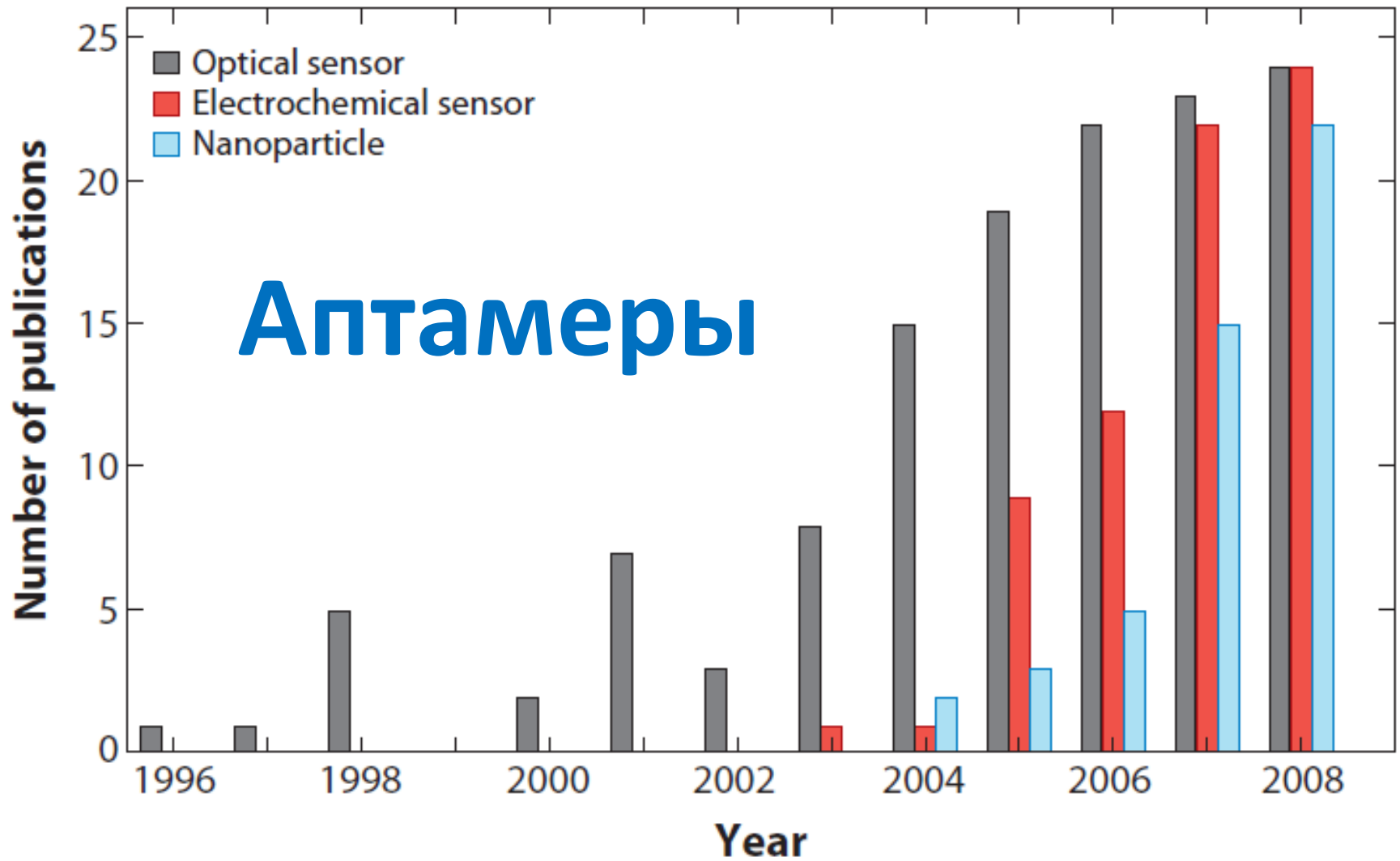
Ковалентное
взаимодействие с Т

Олигонуклеотидные аптамеры



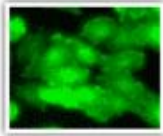
ДНК-аптамер ARC1172 в комплексе с доменом A1 фактора фон Виллебранда

Аптамеры

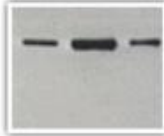
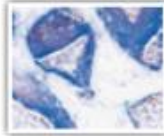


Области современного применения аптамеров

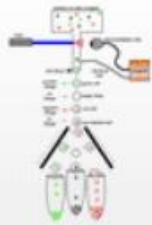
Research Reagent



In Vitro/Vivo Imaging



Western Blot



FACS

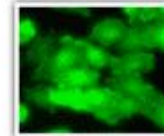


Affinity Chromatography

Medical Diagnosis



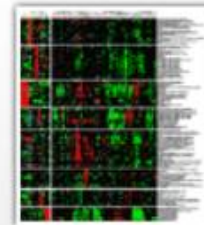
Histochemistry



Cytochemistry



Diagnostic Imaging



Diagnostic Protein Chip

Disease Treatment



Therapeutics



Drug Delivery

Non-medical Diagnosis



Environmental Pollutant Detection



Hazard Detection



Food Inspection

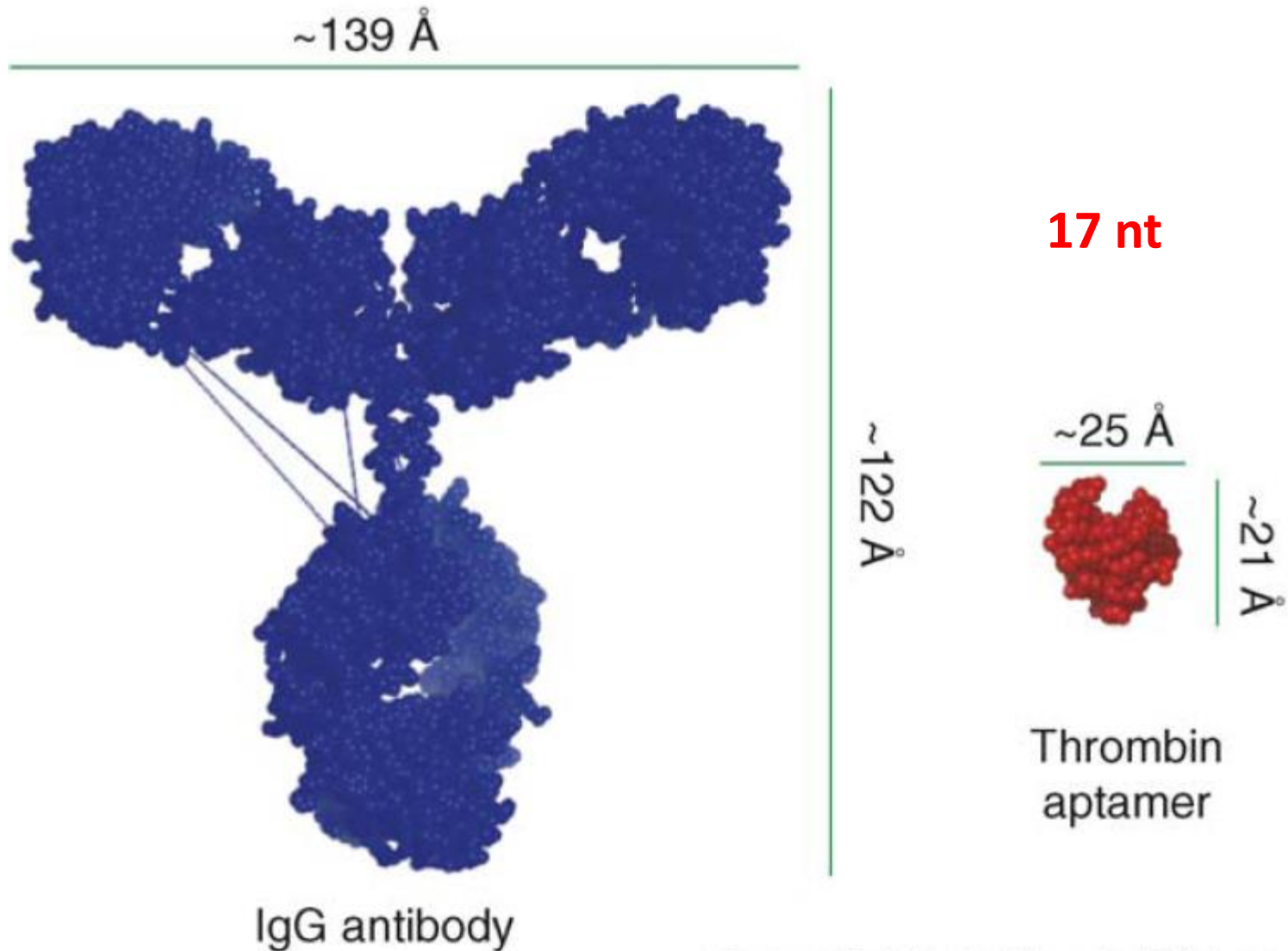


Bio-Production Process



Aptamer

Сравнение размеров молекул антитела и олигонуклеотидного аптамера



Аптамеры, взаимодействующие с небольшими молекулами

- ❖ Разнообразные органические молекулы:
красители, теофиллин, дофамин и т.д.
- ❖ Аминокислоты
- ❖ Нуклеотиды и их производные, биологические
кофакторы: ФМН, НАД, витамин B₁₂
- ❖ Антибиотики
- ❖ Пептидные гормоны

Лиганды аптамеров

Hormones

- Neuropeptide Y
- GnRH
- Ghrelin

Growth Factors

- VEGF
- PDGF
- KGF

Kinases

- ERK-1/2
- PKC β II
- Mek-1
- Raf-1

Blood clotting

- Thrombin
- Factor IXa

Signal transduction targets

- CD18
- Cytohesin-1
- Cytohesin-2

Proteases

- Thrombin
- Neutrophil
- Elastase
- Activated Protein C
- PSMA

Membrane prot. & receptors

- Neurotensin Receptor 1
- L-Selectin
- gp120
- CTLA-4

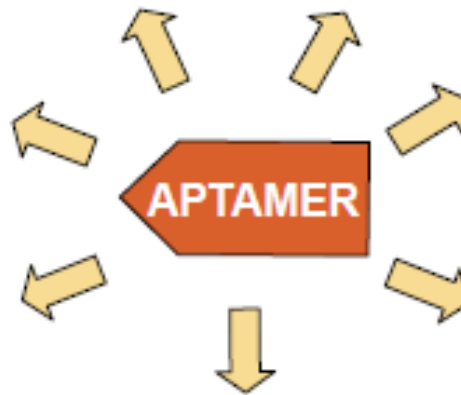
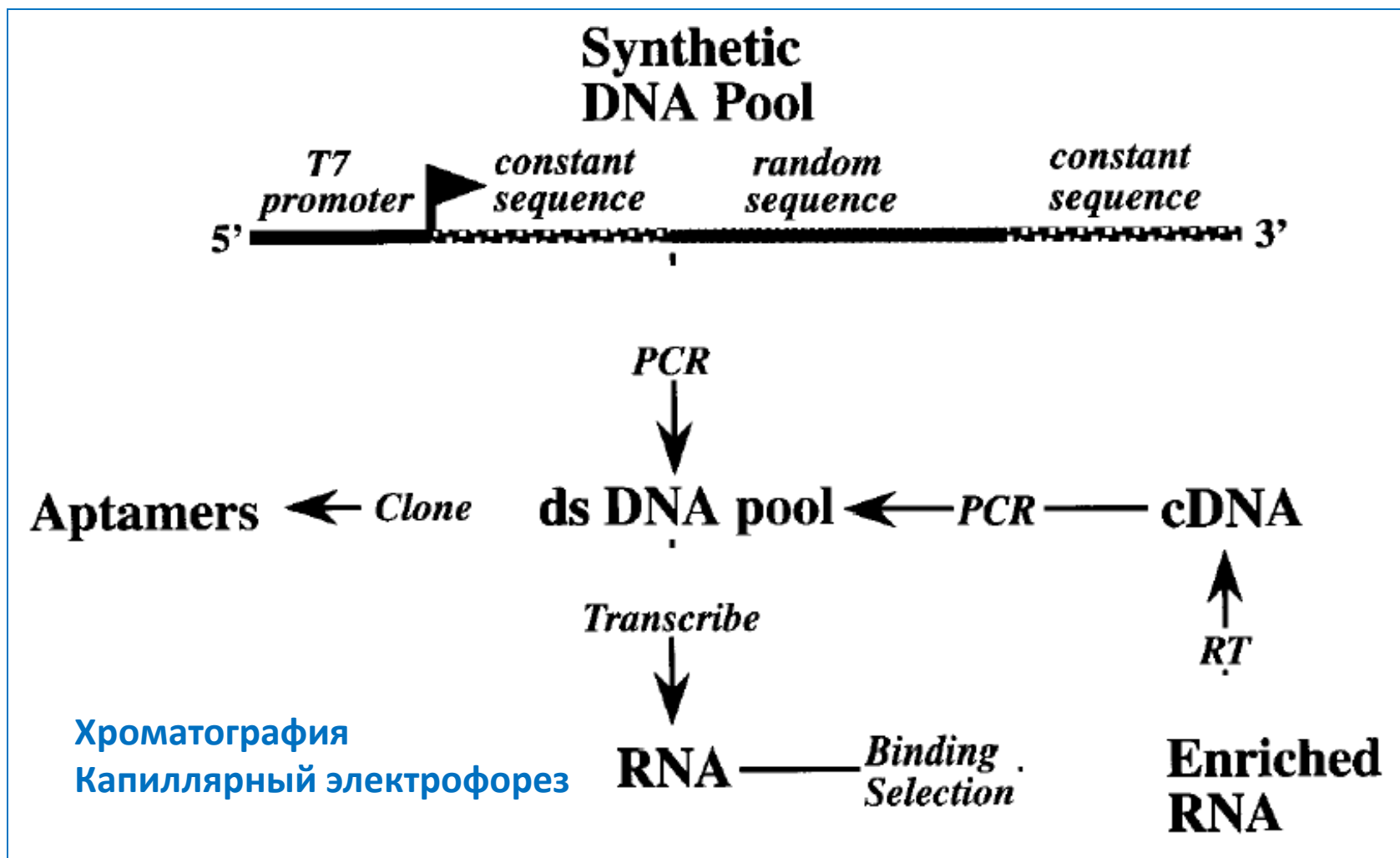
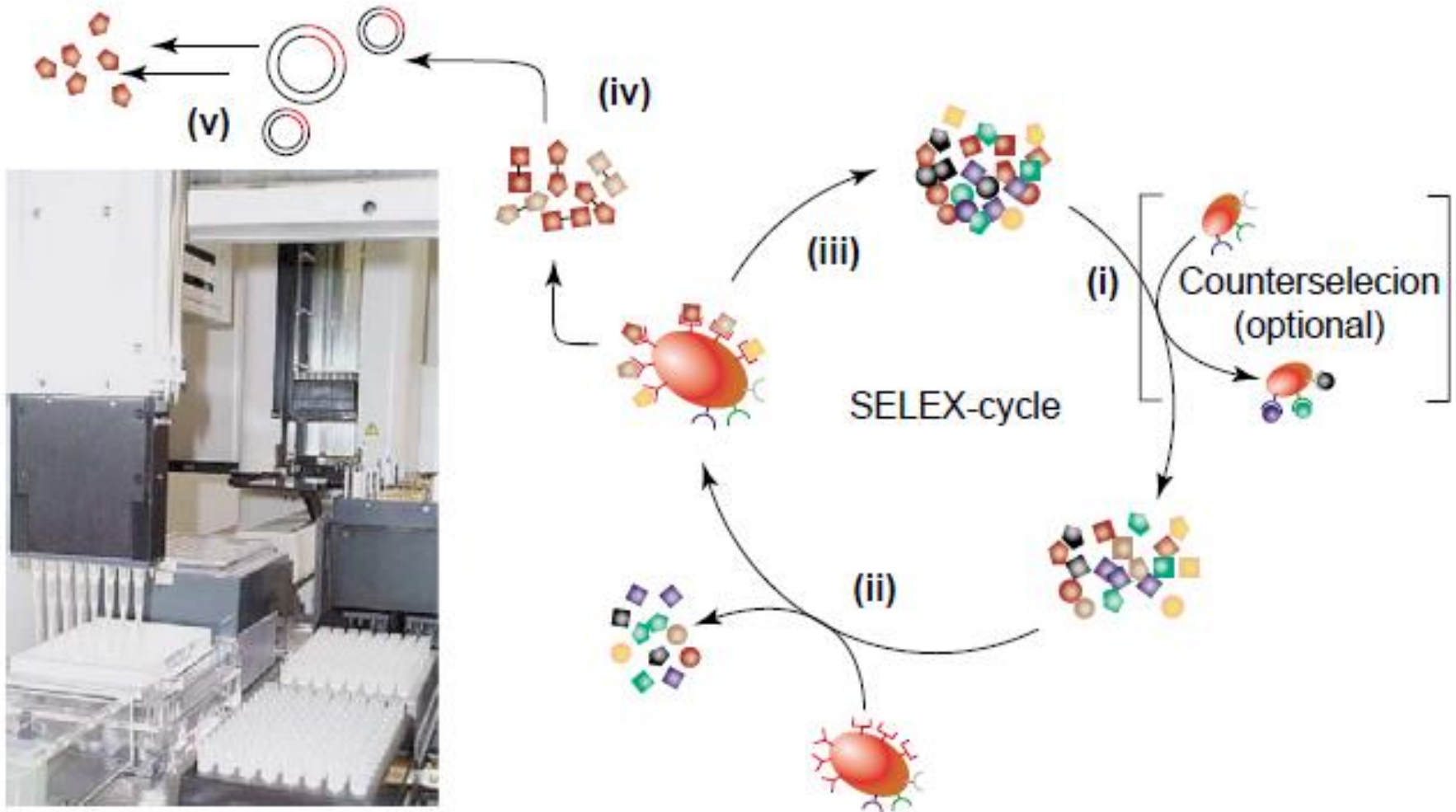


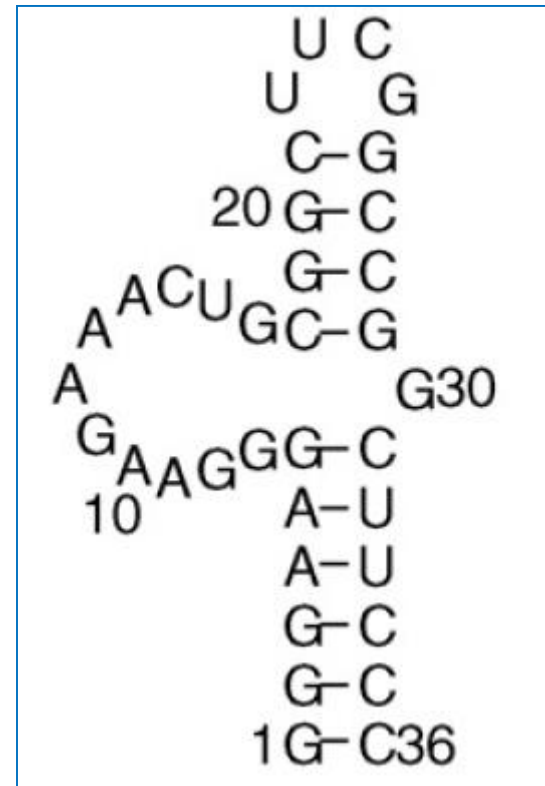
Схема отбора олигонуклеотидных аптамеров из комбинаторной библиотеки



Автоматизированная система отбора аптамеров RNA-SELEX



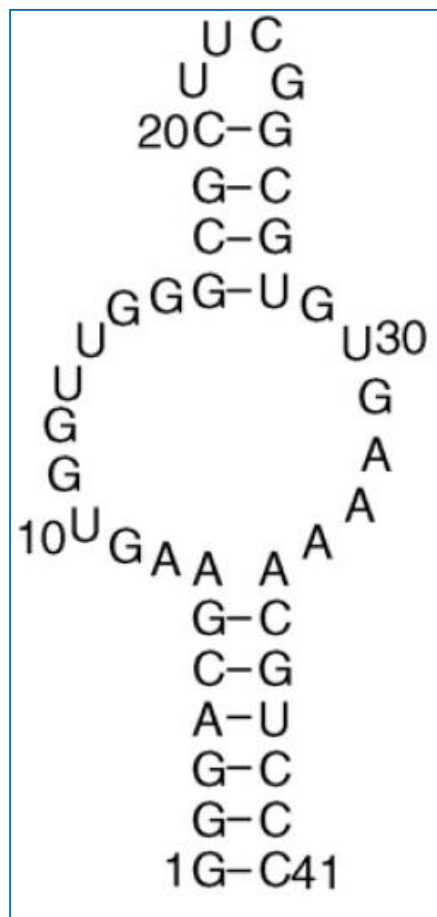
РНК-аптамер, взаимодействующий с АМР



36 nt

Контакты преимущественно с кольцом
аденина, но не рибозой.
Может связывать АТР, NAD

РНК-аптамер, взаимодействующий с GTP



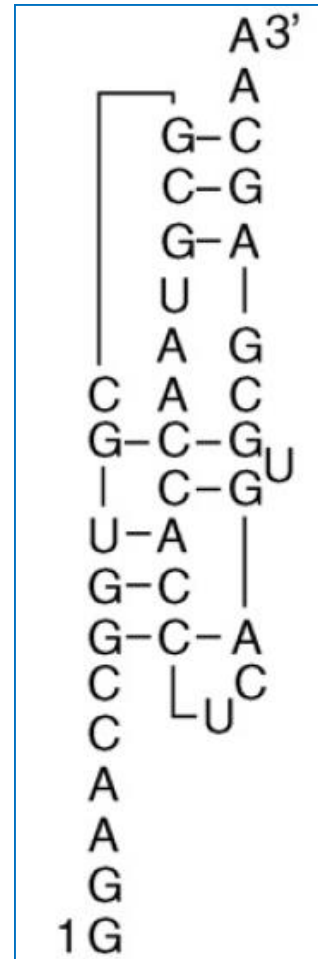
41 nt

Лиганд погружен в
связывающий карман

$K_D \sim 75$ nM

Обнаруживает много
третичных
взаимодействий,
объясняющих высокое
сродство аптамера к
лиганду

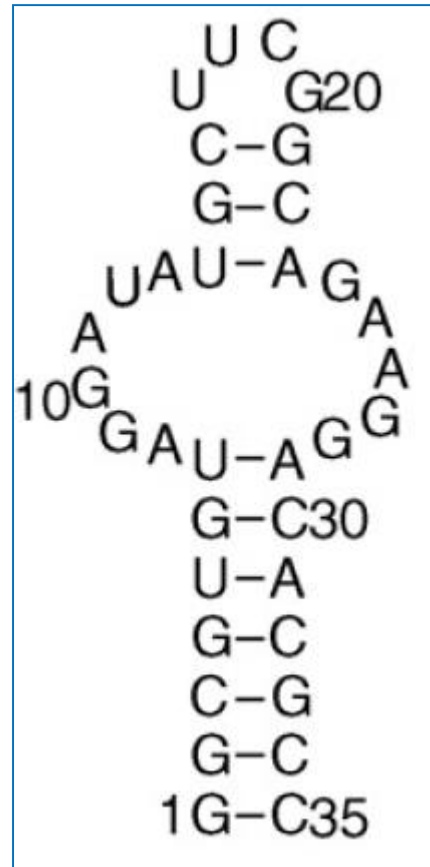
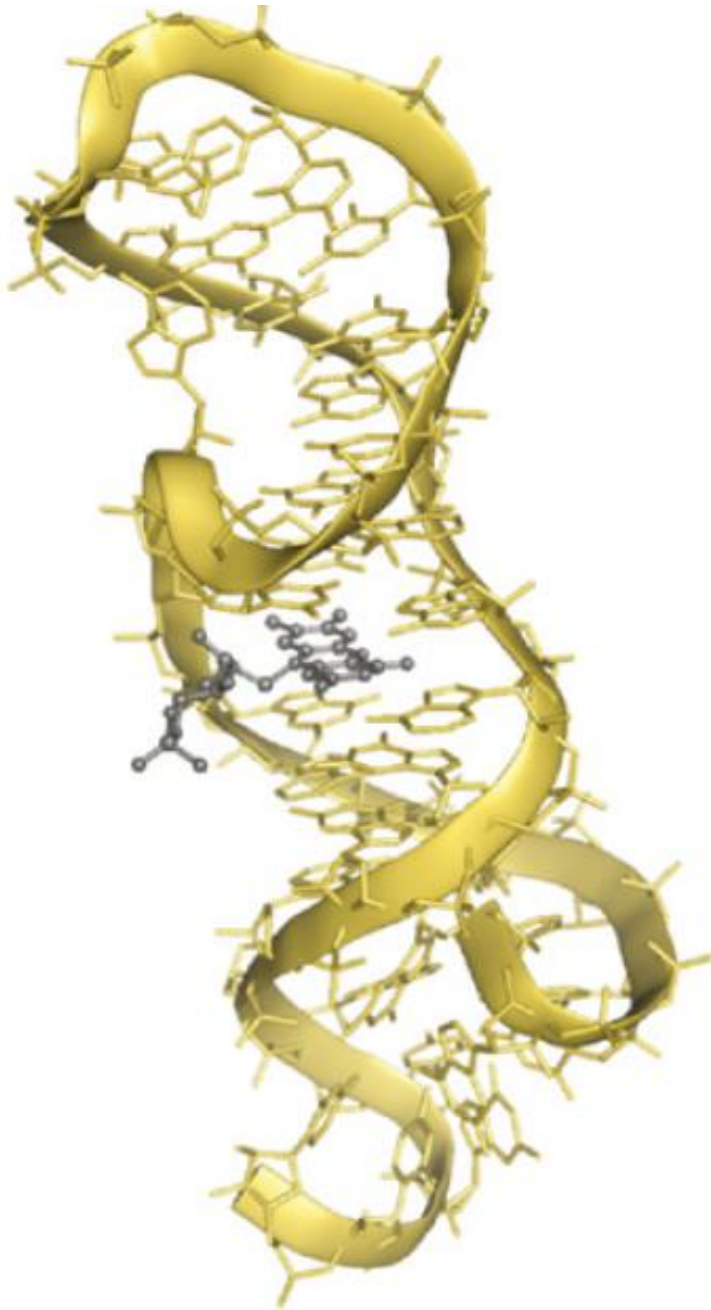
РНК-аптамер, взаимодействующий с витамином В12



Лиганд
взаимодействует с
периферией
аптамера

35 nt

РНК-аптамер, взаимодействующий с FMN



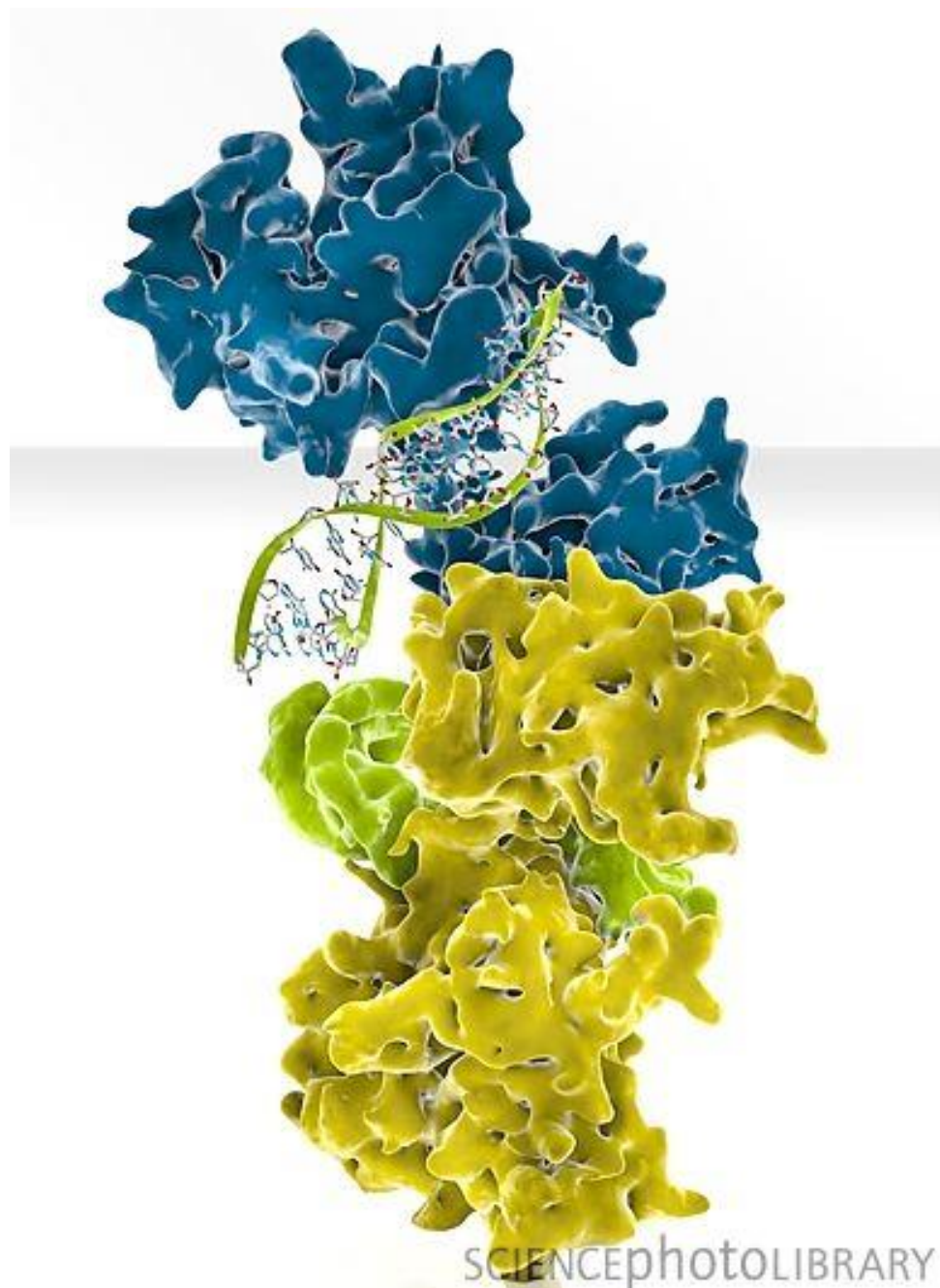
FMN погружен в ДНК и образует водородные связи по границе изоаллоксазинового кольца

35 nt

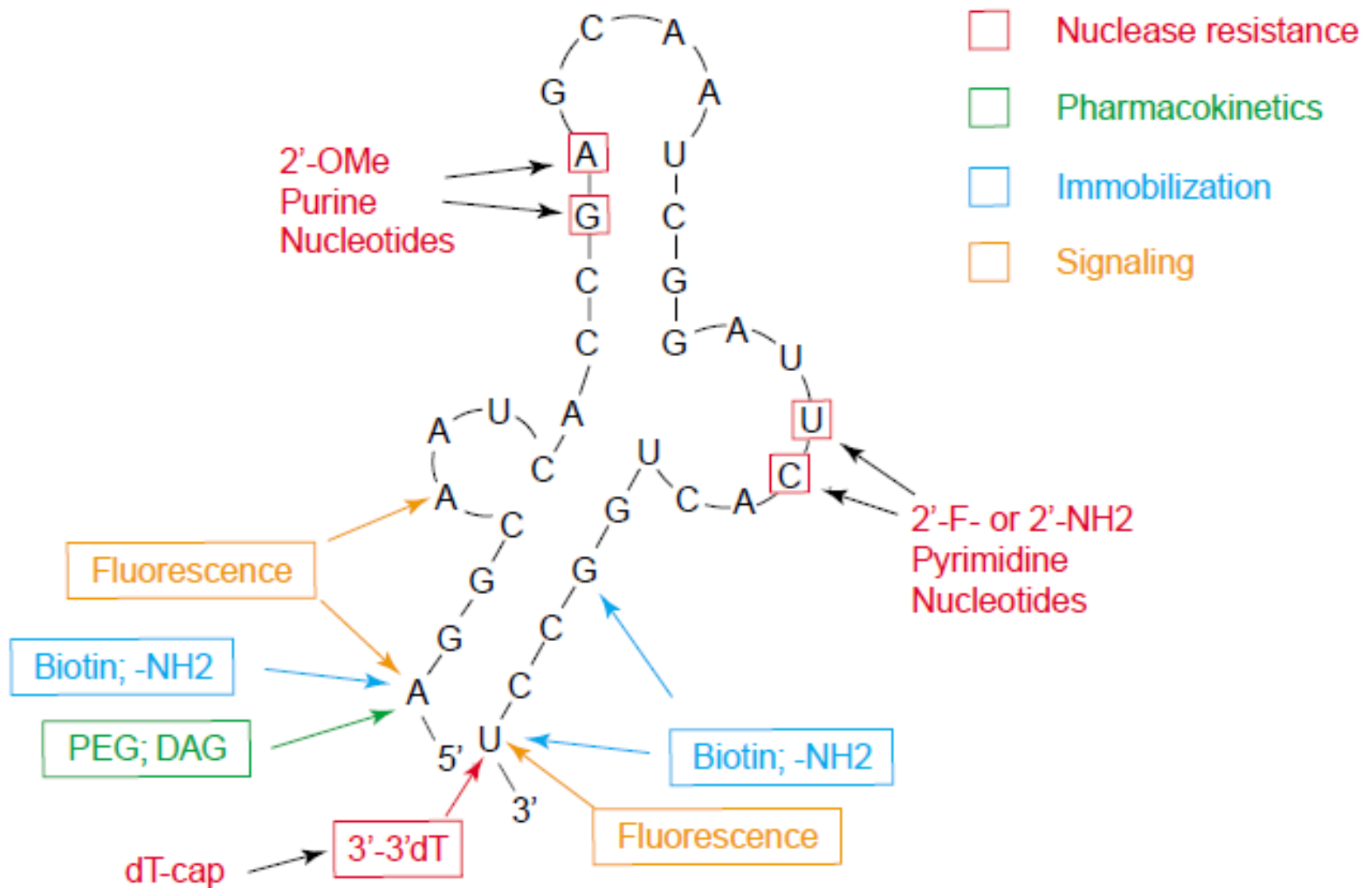
РНК-аптамер, ингибирующий фактор транскрипции NF- κ B

Аптамер (зеленый) представлен в двух разных видах в комплексе с двумя молекулами фактора транскрипции

Подавление реакции воспаления



Модификации аптамеров



Зеркальные аптамеры- шпигельмеры (Spiegelmer)

L-Рибоза или *L*-2'-дезоксирибоза в сахаро-фосфатном остове

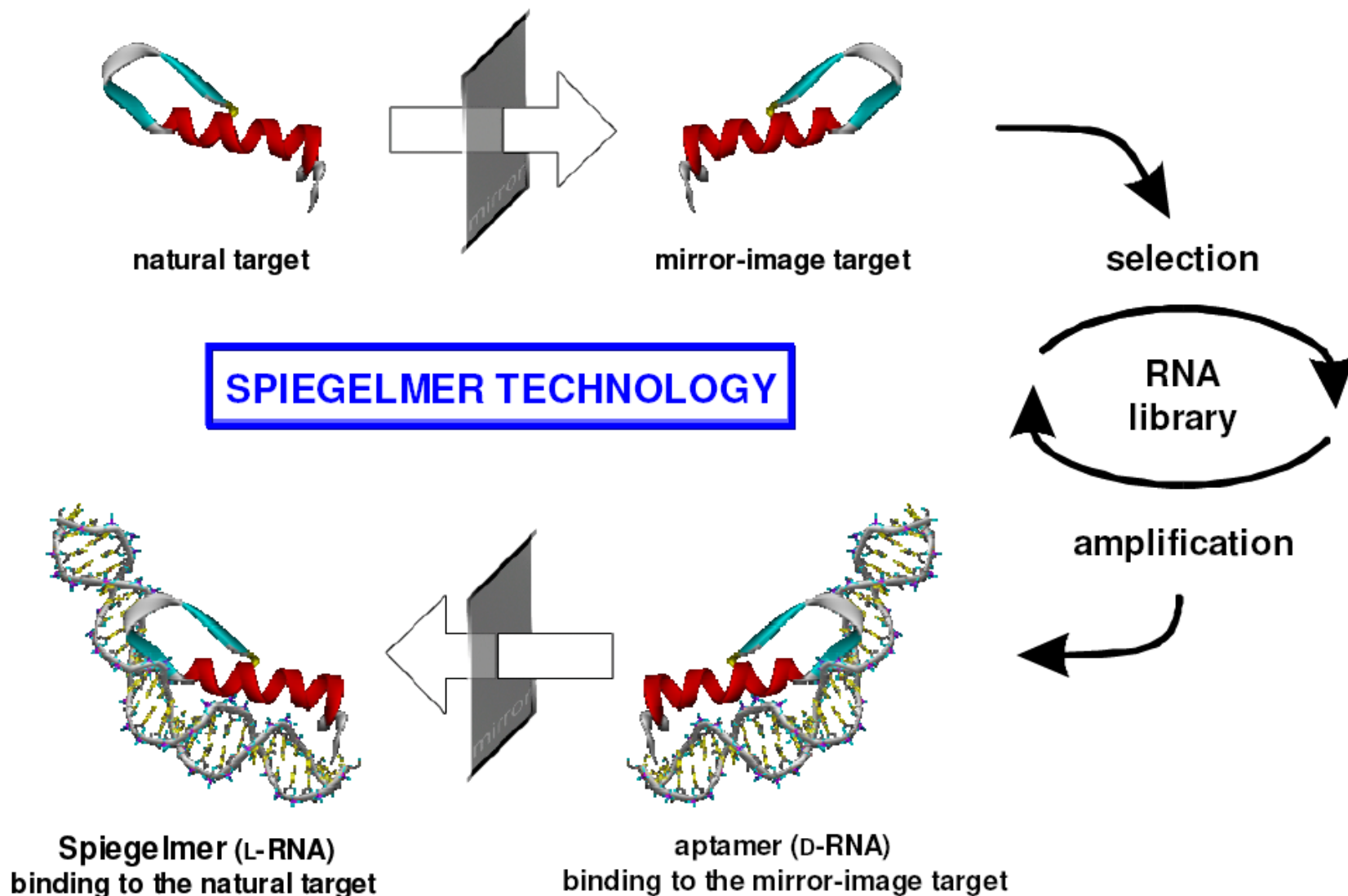
Получение:

- 1) Обычный отбор среди нуклеиновых кислот с *D*-сахарами. Лиганды – полипептиды, построенные из *D*-изомеров аминокислотных остатков.
- 2) После определения первичной структуры – химический синтез из аналогов нуклеотидов, содержащих *L*-сахара. Синтезированные шпигельмеры взаимодействуют с природными белками

Преимущество перед обычными аптамерами:

Устойчивость к нуклеазам

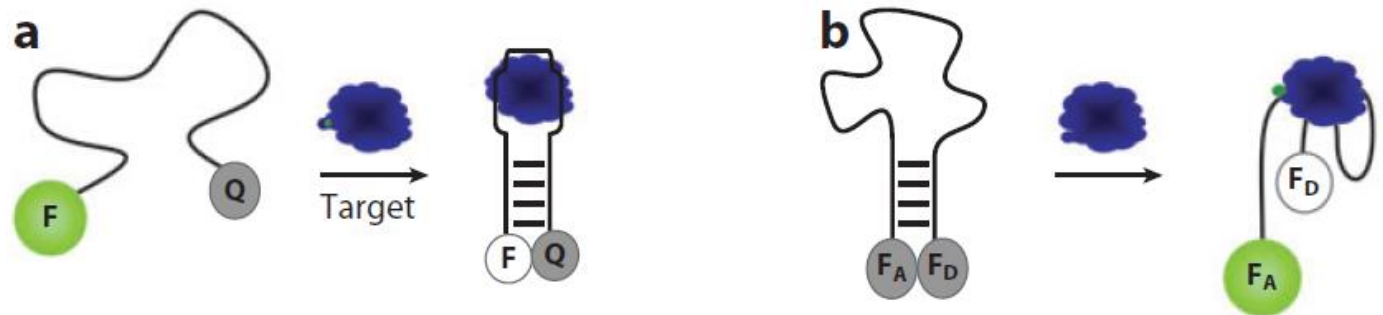
Технология получения шпигельмеров



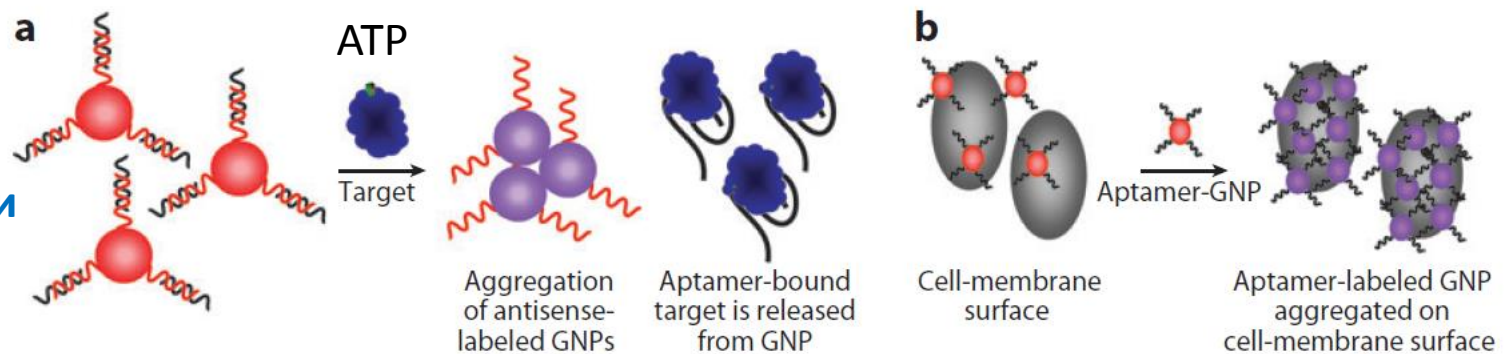
Биосенсоры на основе олигонуклеотидных аптамеров

Биосенсоры – молекулярные устройства, количественно преобразующие сигнал от внешних воздействий в измеримый сигнал другой природы

Аптамеры -
биконы

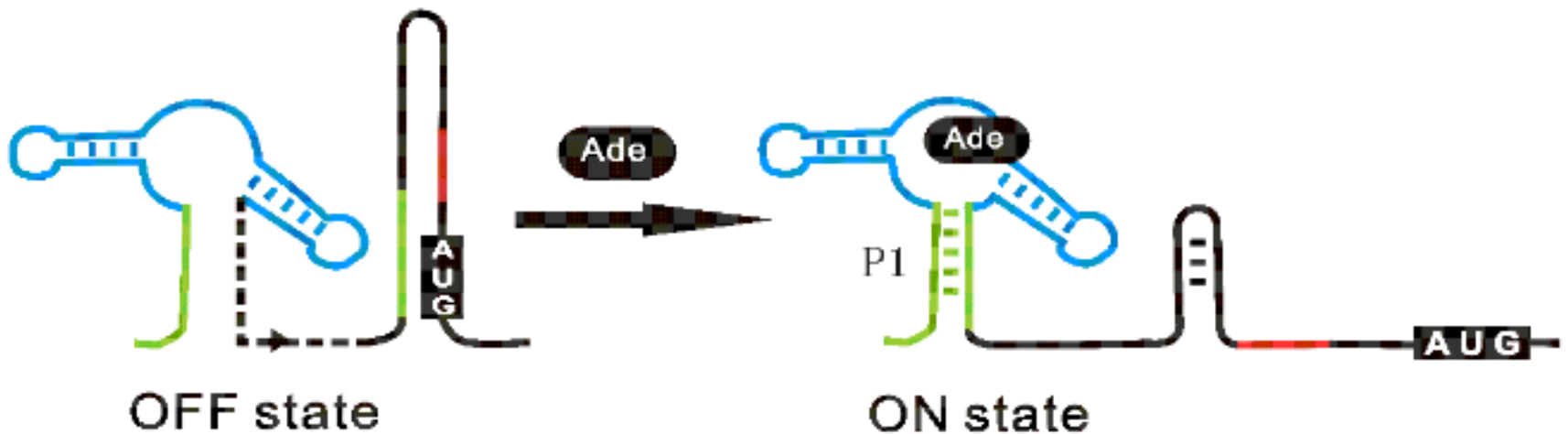


Конъюгаты с
наночастицами
золота



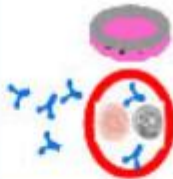
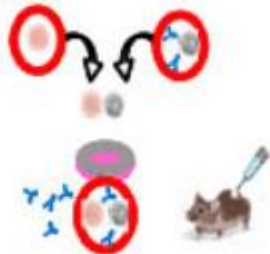
GNP – Gold Nanoparticles (Au-NP) - наночастицы золота

Искусственный рибосвитч (riboswitch) на основе аптамера, взаимодействующего с аденином

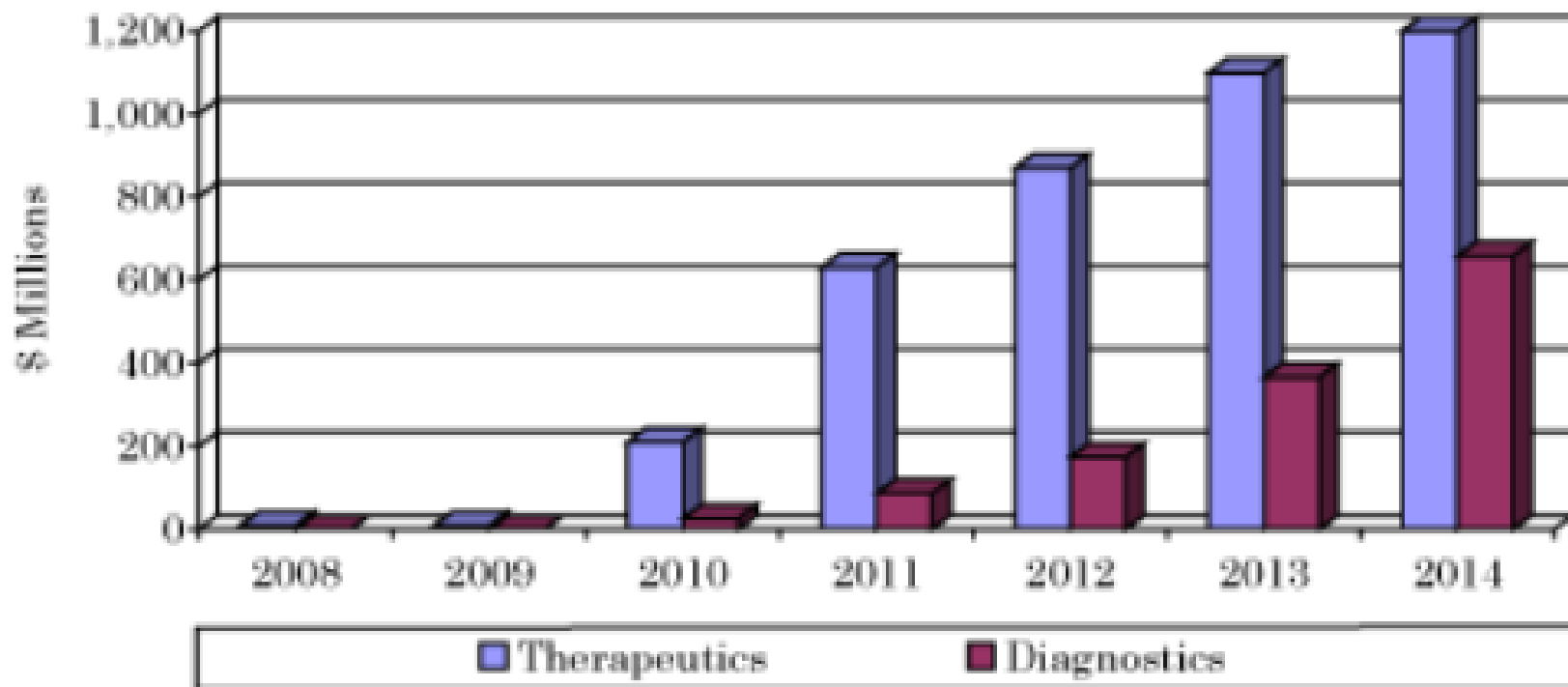


В присутствии аденина в 5'-UTR мРНК, содержащей аптамер, образуется шпилька P1, что приводит к освобождению иницирующего AUG-кодона, который становится доступным рибосомам

Преимущества олигонуклеотидных аптамеров перед антителами

	Aptamer Technology	Antibody Technology
Production	 Chemical synthesis Inexpensive easy	 Cell culture and animal need Expensive Labor intensive
Discovery time	 SELEX 8 weeks	 ~6 months
Stability	 Stable in harsh condition No loss of activity	 Unstable in harsh condition Potential loss of functions
Modification	Easy for chemical modification fluorecent, affinity tag.	Difficult for chemical modification
Size	Small size (<30 KDa) Easy membrane penetration, short blood residence	Large size (~150 KDa) Difficult membrane penetration, long blood residence

Глобальный рынок аптамеров медицинского назначения (млн \$)



Томас Чек – первооткрыватель рибозимов



Thomas Cech (Т. Чек, 1947)

1982 г. Аутосплайсинг интрона рибосомной
35S-РНК жгутикового простейшего
Tetrahymena

*Нобелевская премия по химии 1989 г.
совместно с Sidney Altman*

Cech Lab in the JSCBB, August 2013



Сидни Олтман (Sidney Altman) получает Нобелевскую премию за РНКазу Р



Каталитический цикл рибозима

Данные кинетического и рентгеноструктурного анализа

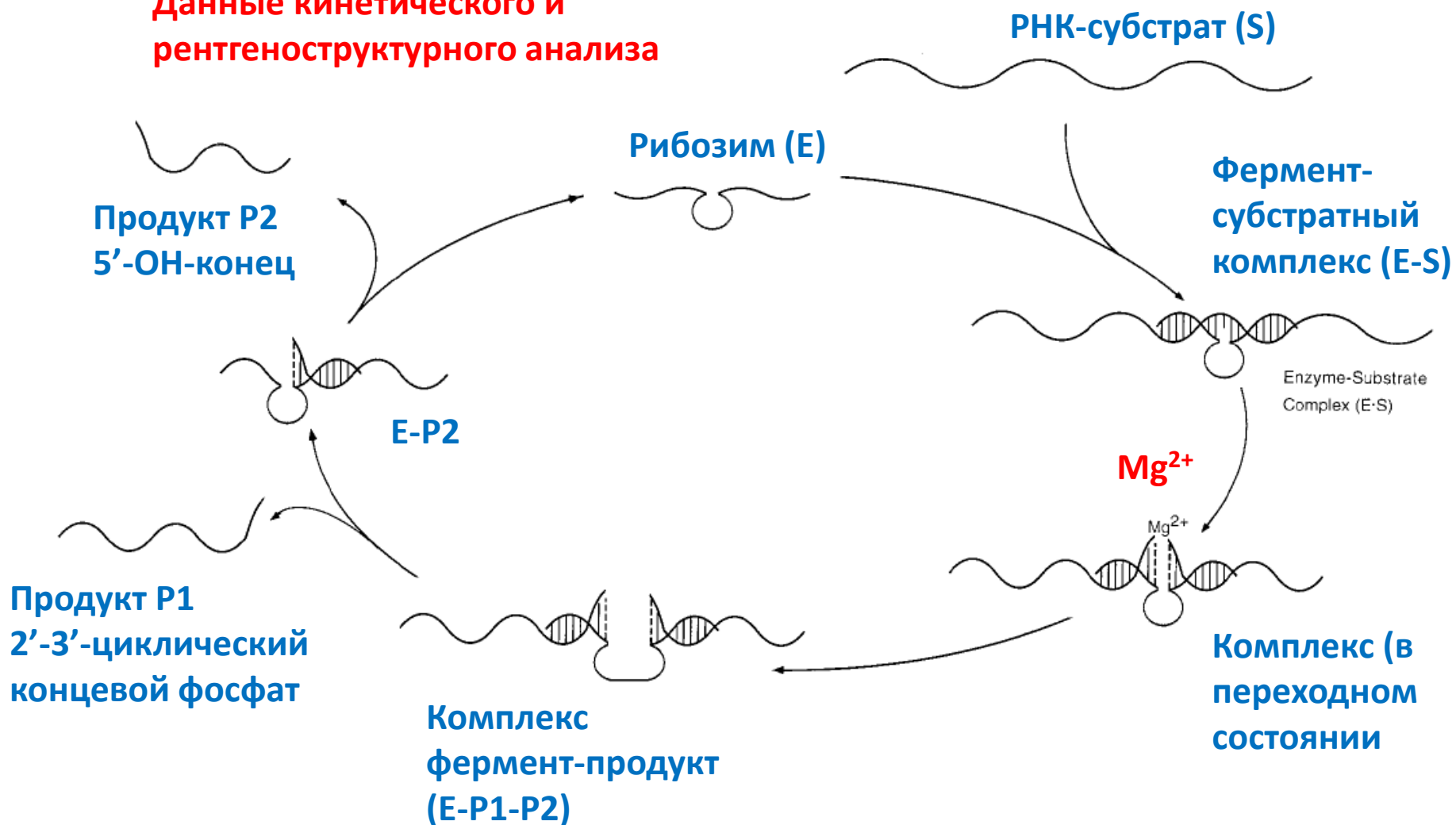
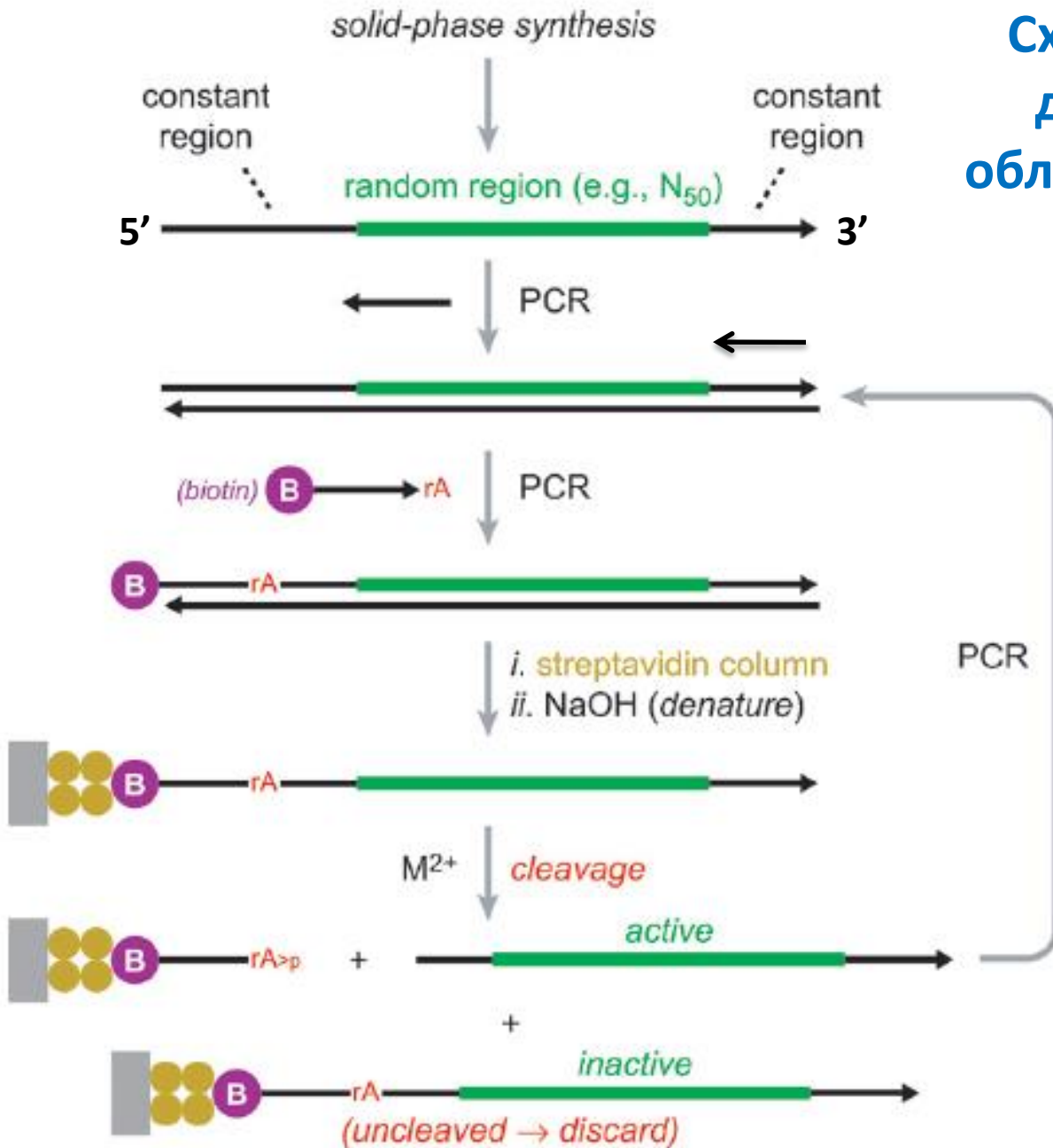


Схема отбора *in vitro* дезоксирибозима, обладающего РНКазной активностью



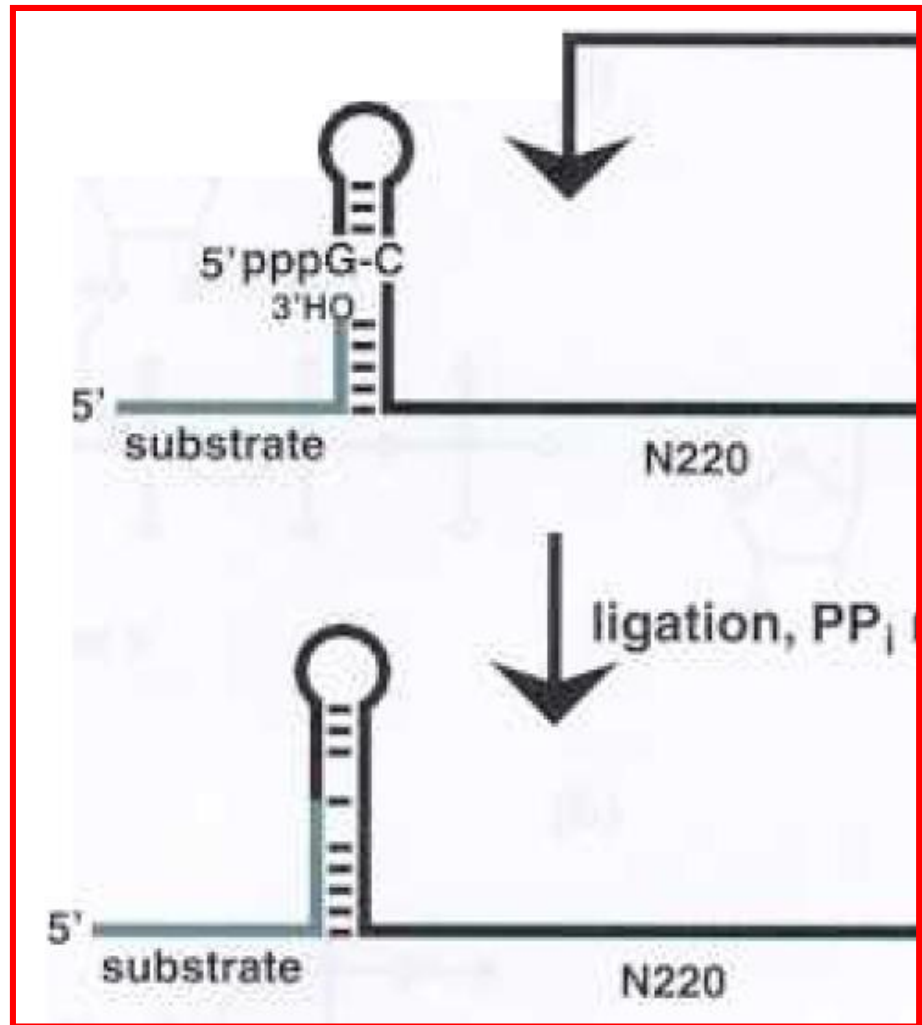
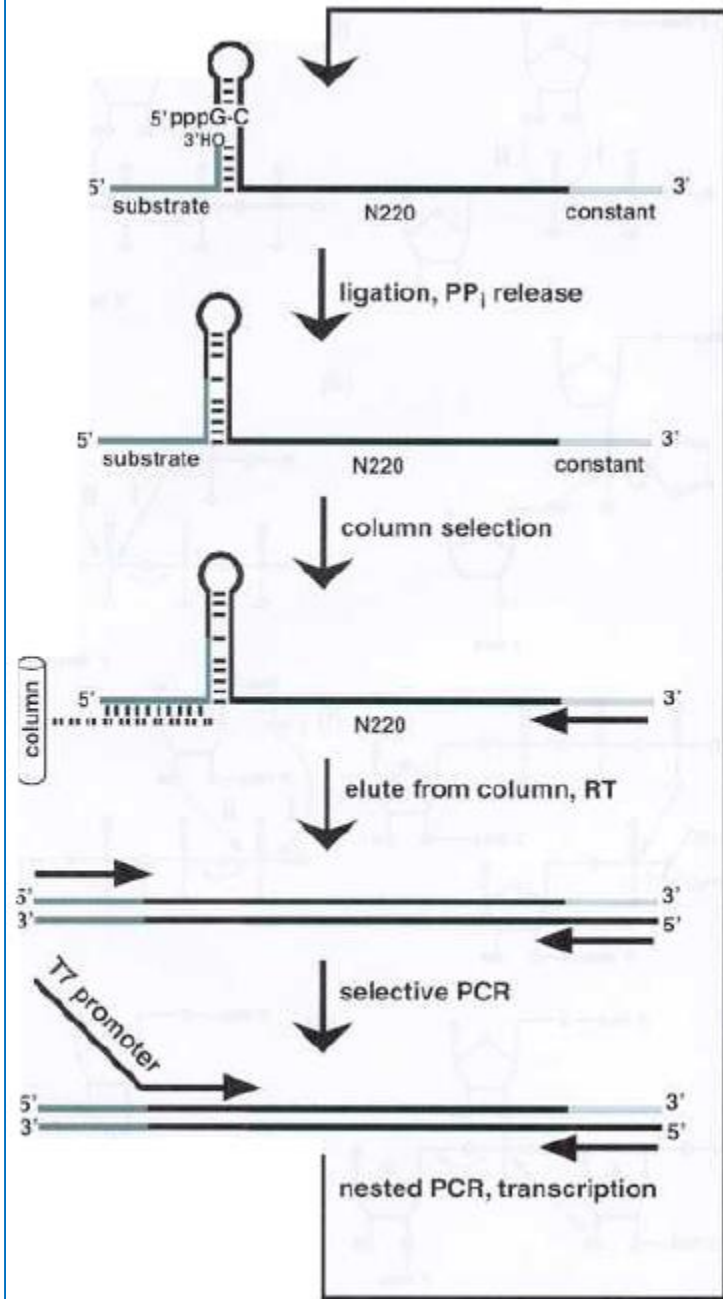
B - биотин

rA – АМР
(рибонукдеозид-
монофосфат)

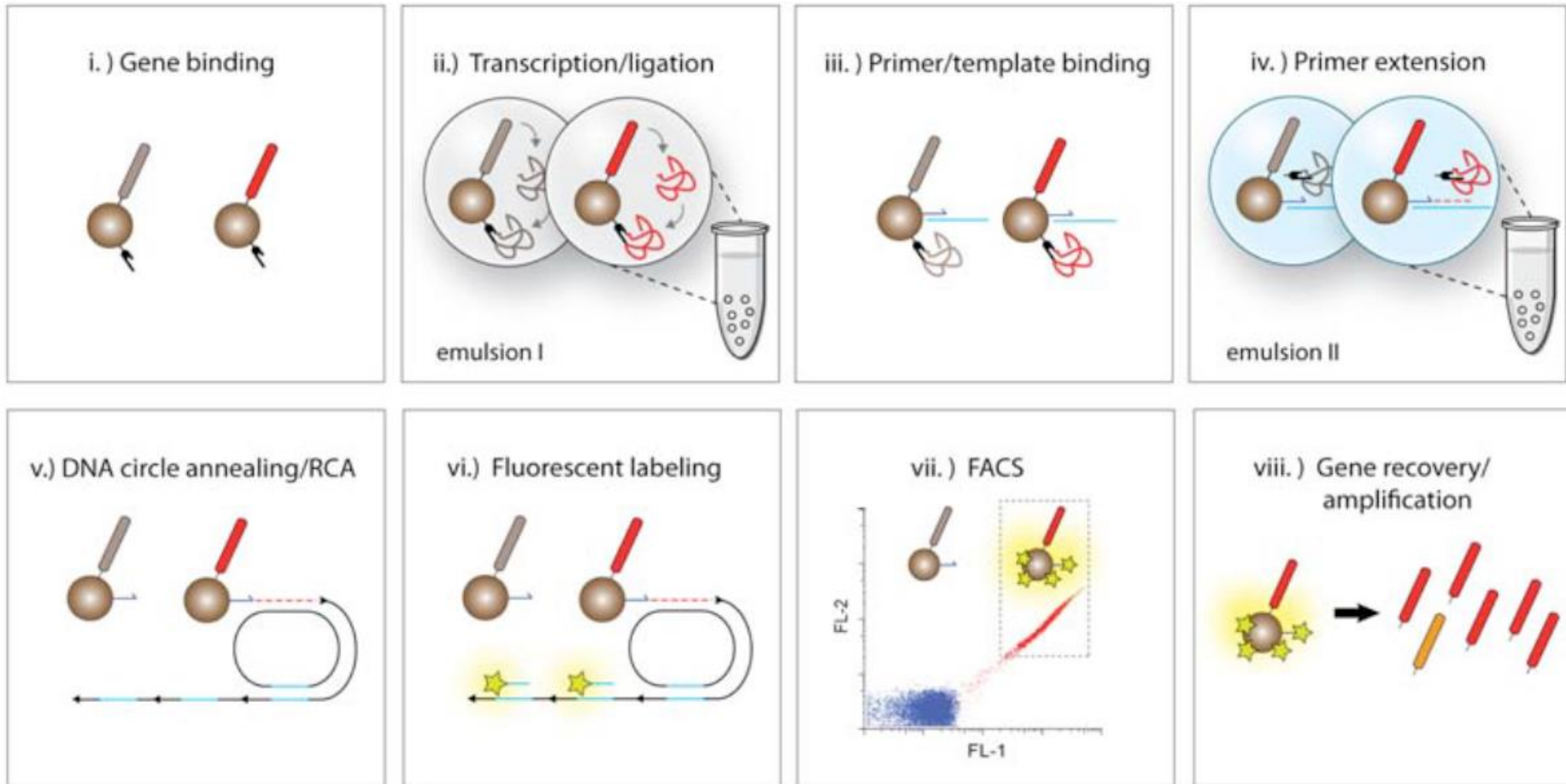
Фолдинг оцДНК
Гидролиз субстрата

Нерасщепленную оцДНК
отбрасывают

Получение рибозима с РНК-лигазной активностью



Получение рибозима, обладающего РНК-полимеразной активностью методом СBT (Compartmentalized Bead-Tagging)

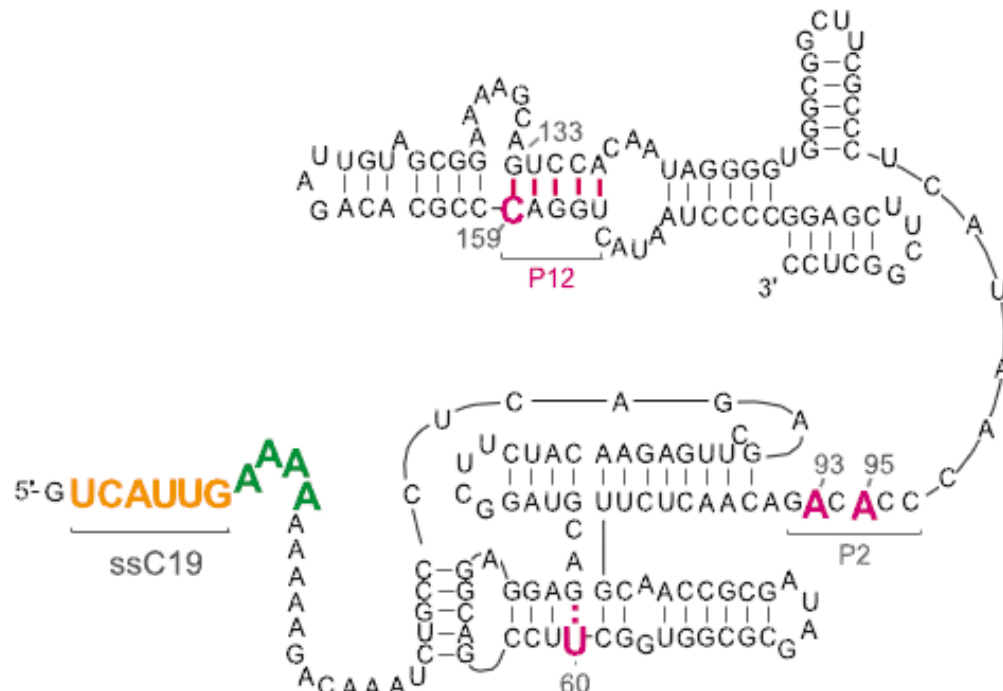


Различия в первичной структуре между исходным и окончательным рибозимом, обладающим РНК-полимеразной активностью



R18

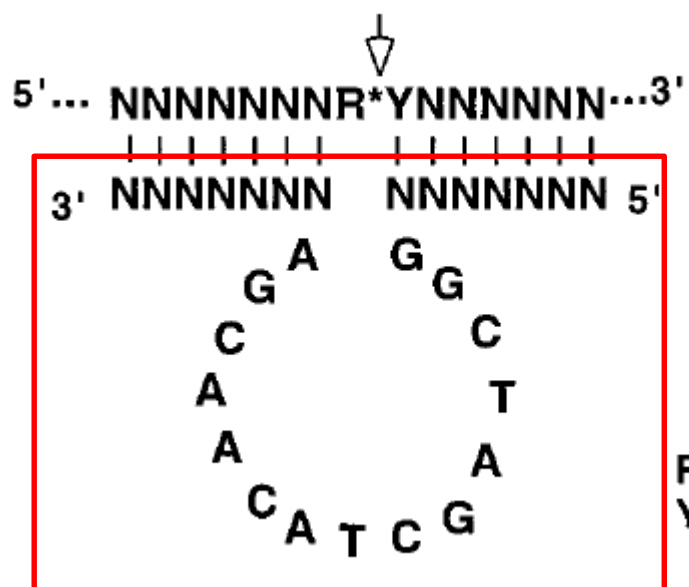
Исходный рибозим



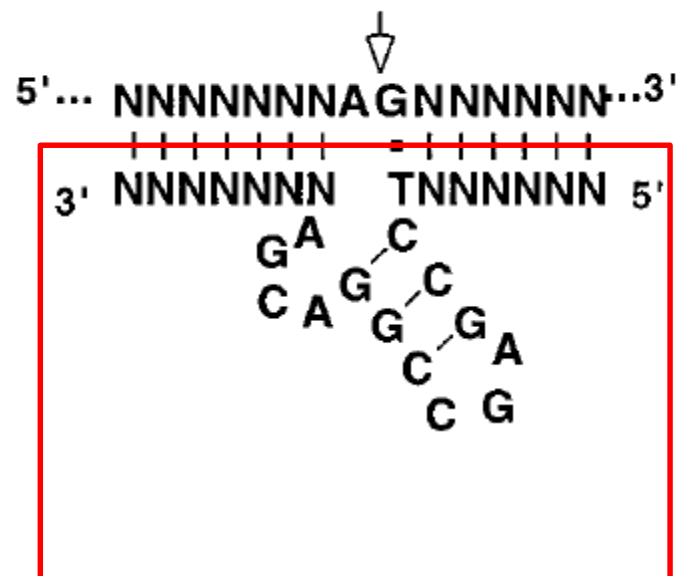
tC19Z

Окончательный вариант рибозима

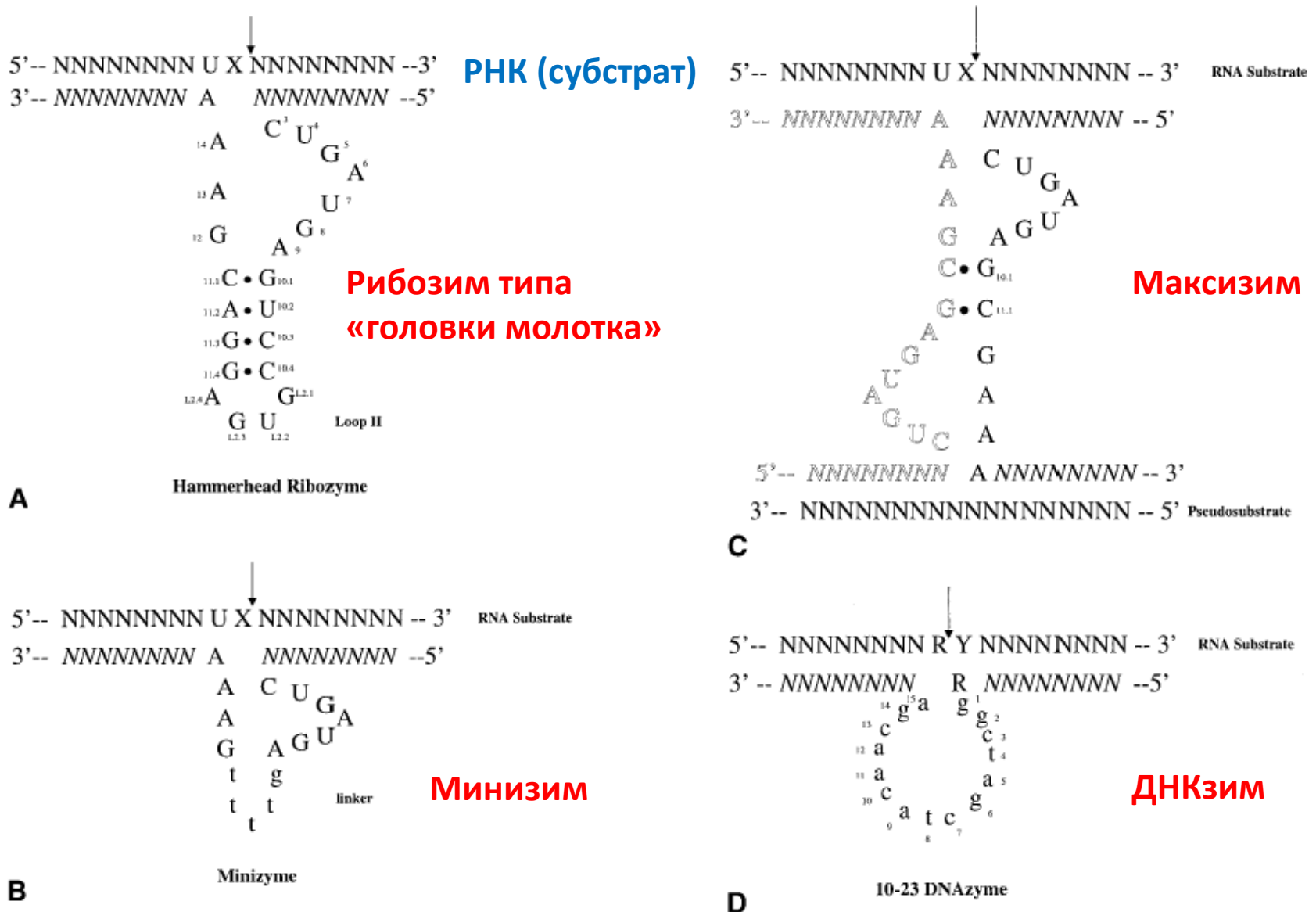
ДНКзимы, обладающие РНКазной активностью



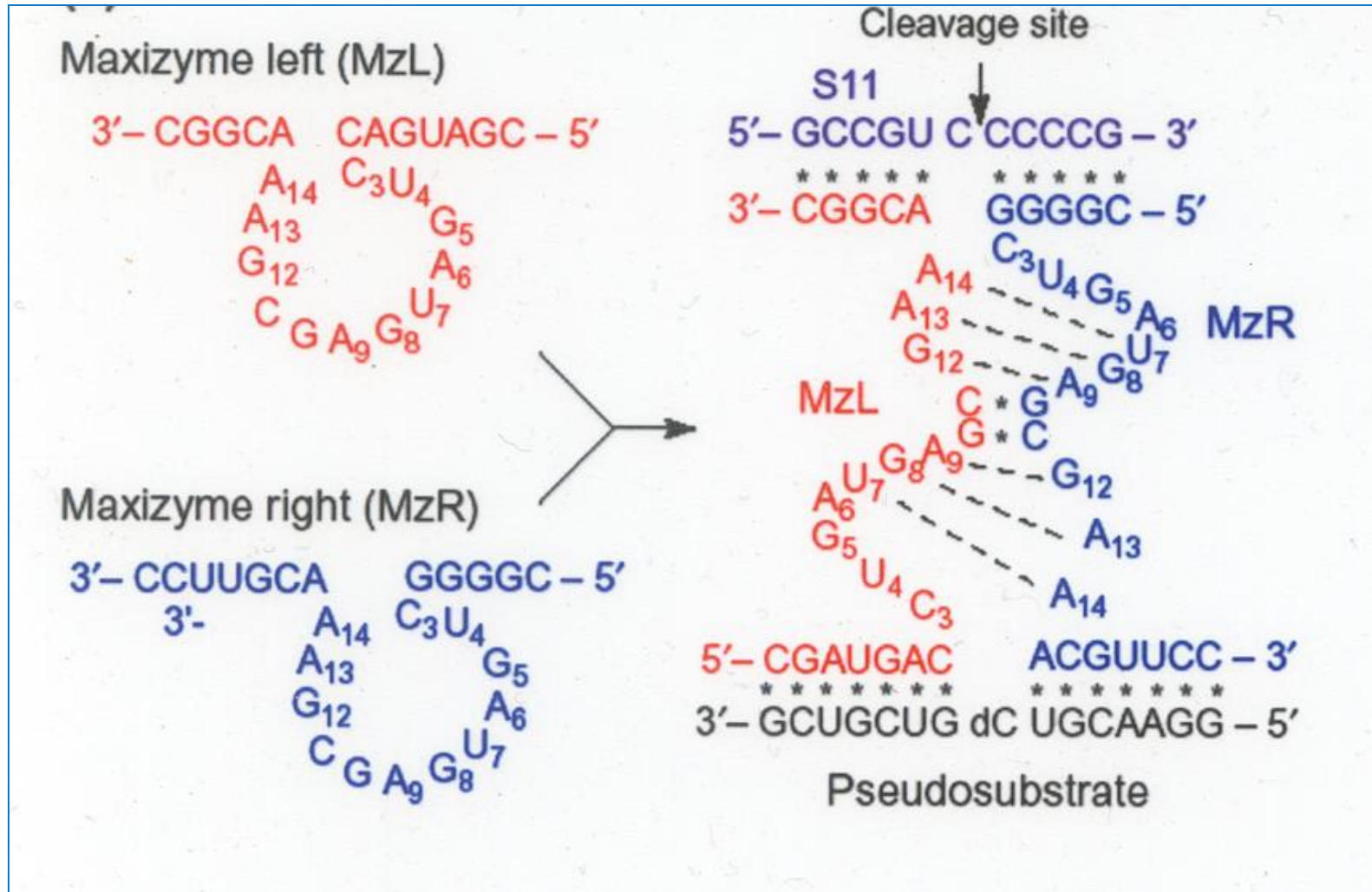
Субстрат
РНК



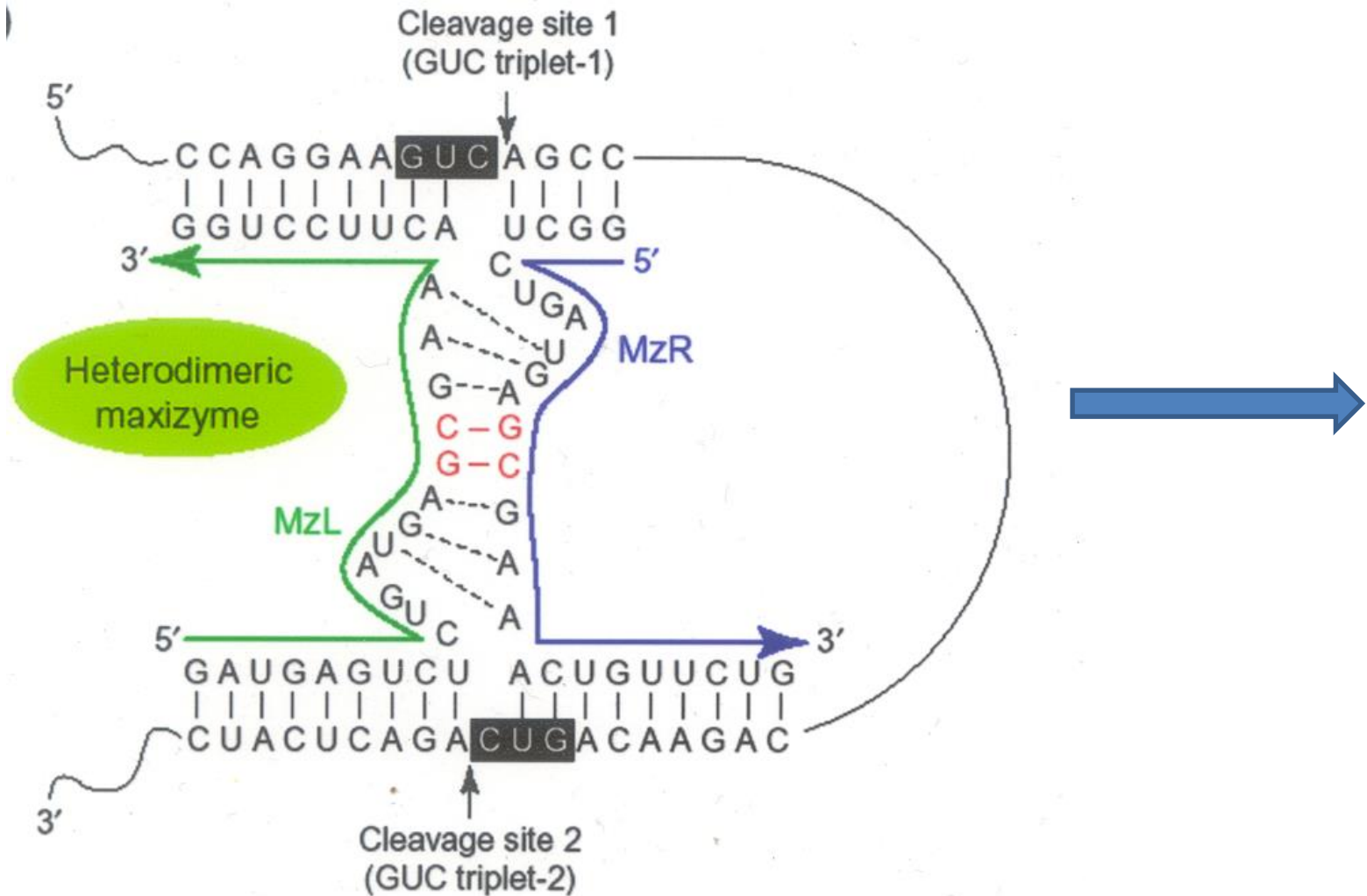
Подтипы рибозимов, сконструированных на основе рибозима типа «головки молотка»



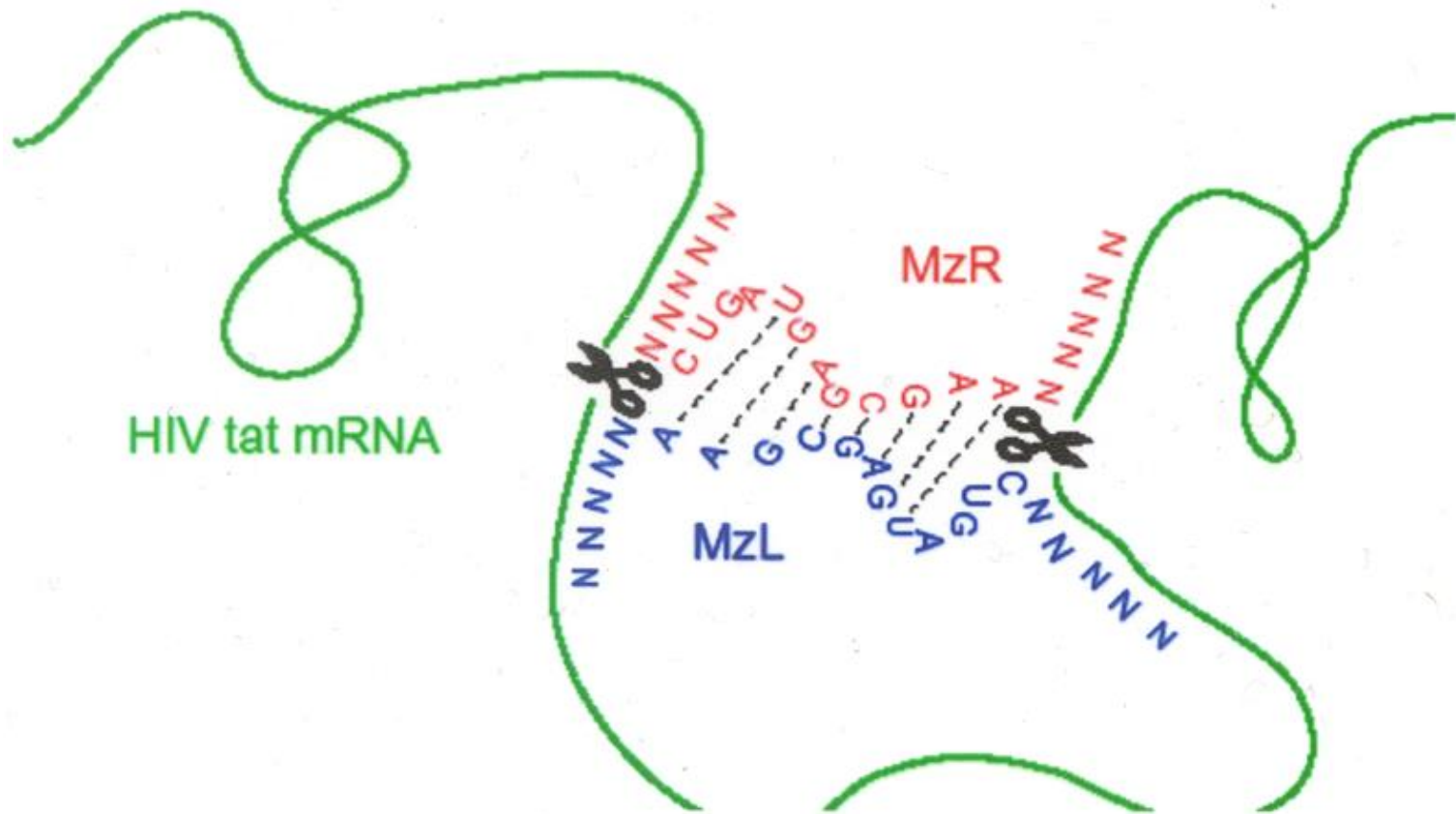
Сборка активного максизима



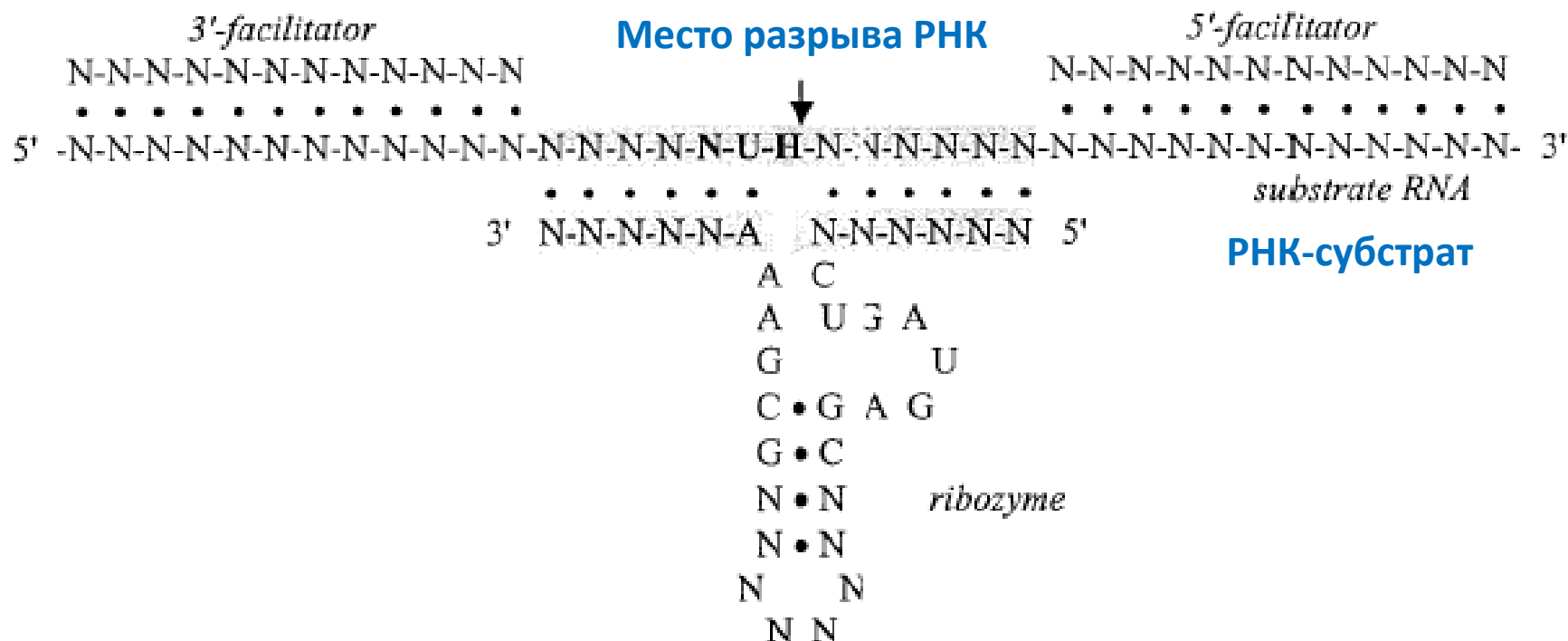
Подавление репликации HIV гетеродимерным максизимом



Подавление репликации HIV гетеродимерным максизимом (окончание)

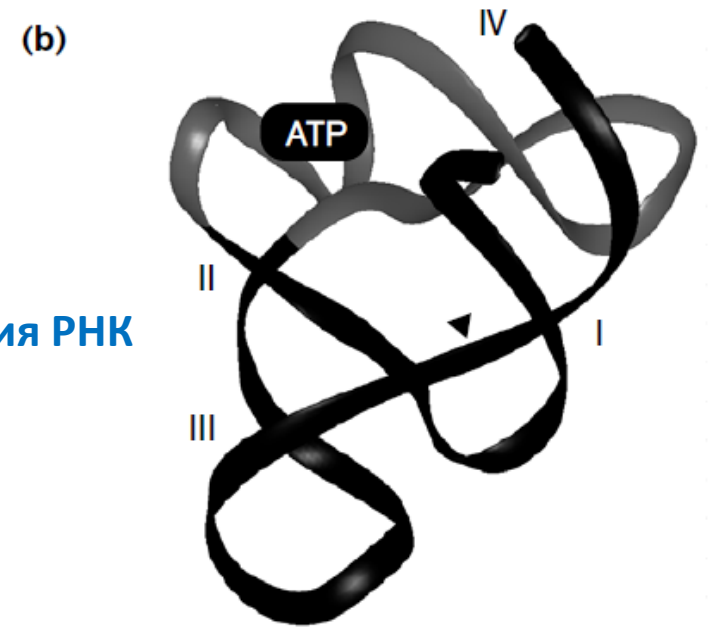
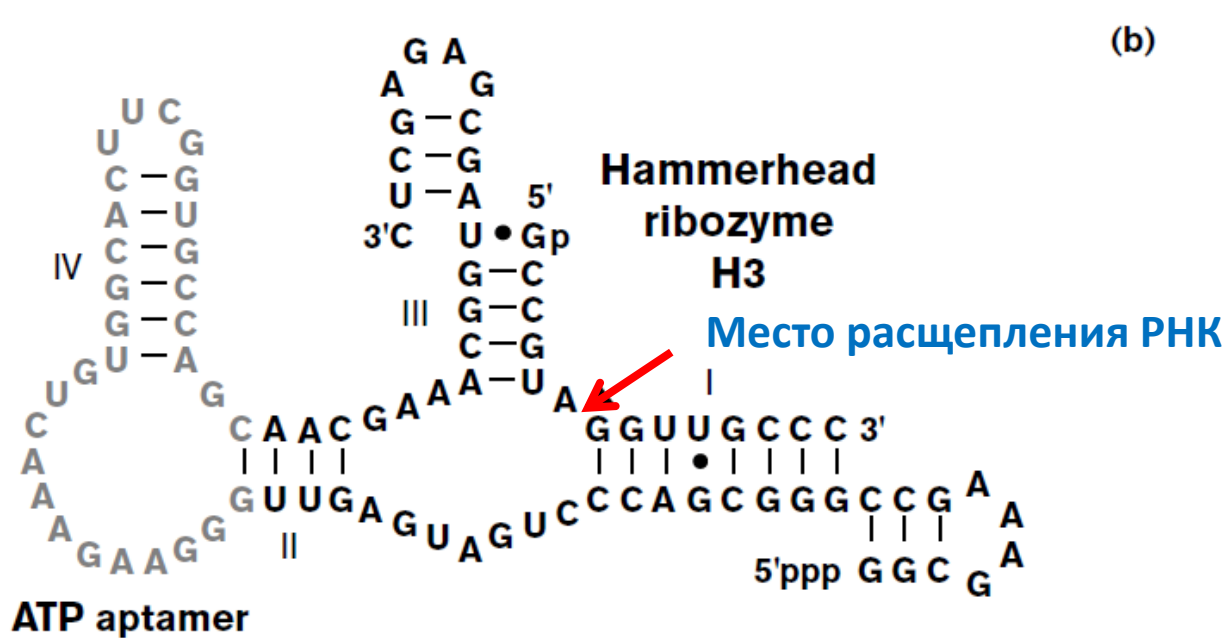


Использование олигонуклеотидов-помощников для повышения эффективности действия рибозимов



Два олигонуклеотида, комплементарных РНК-субстрату, изменяют ее третичную структуру

Аллостерический рибозим (аптазим) и его пространственная структура

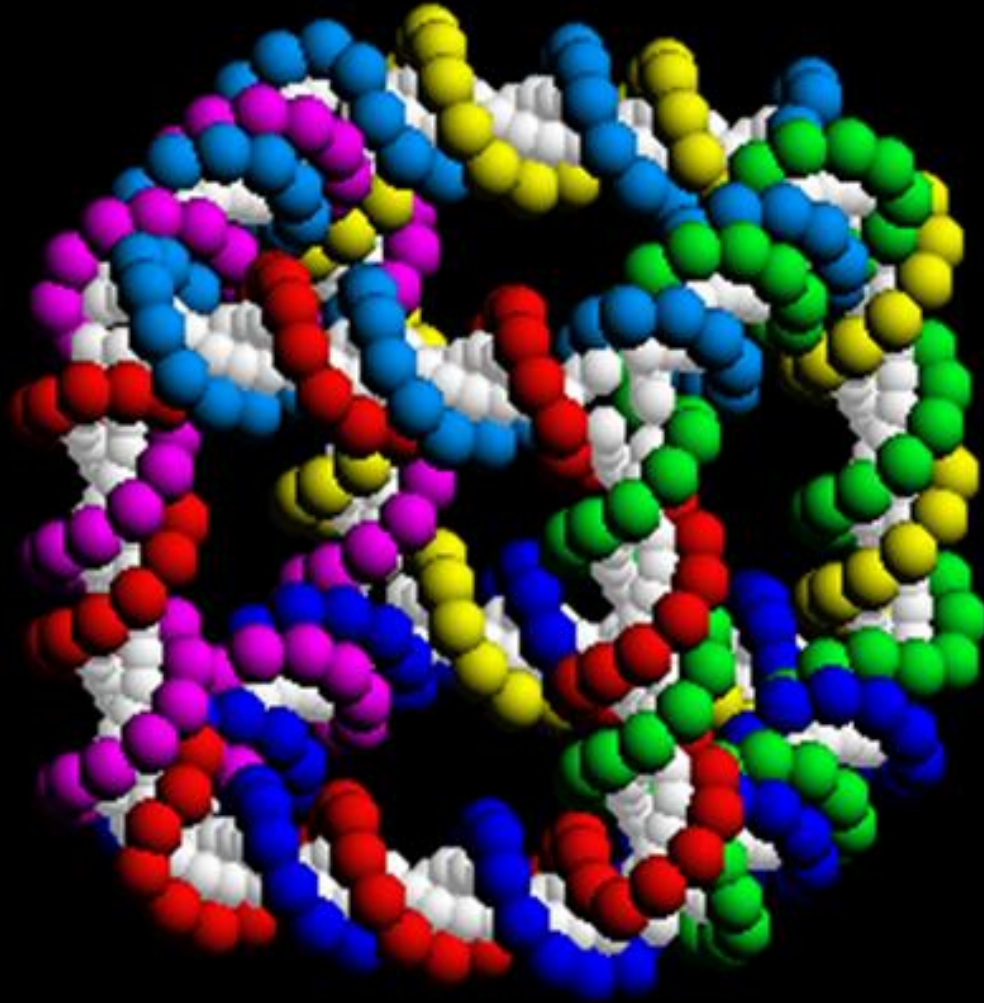


Связывание АТФ ингибирует рибозим

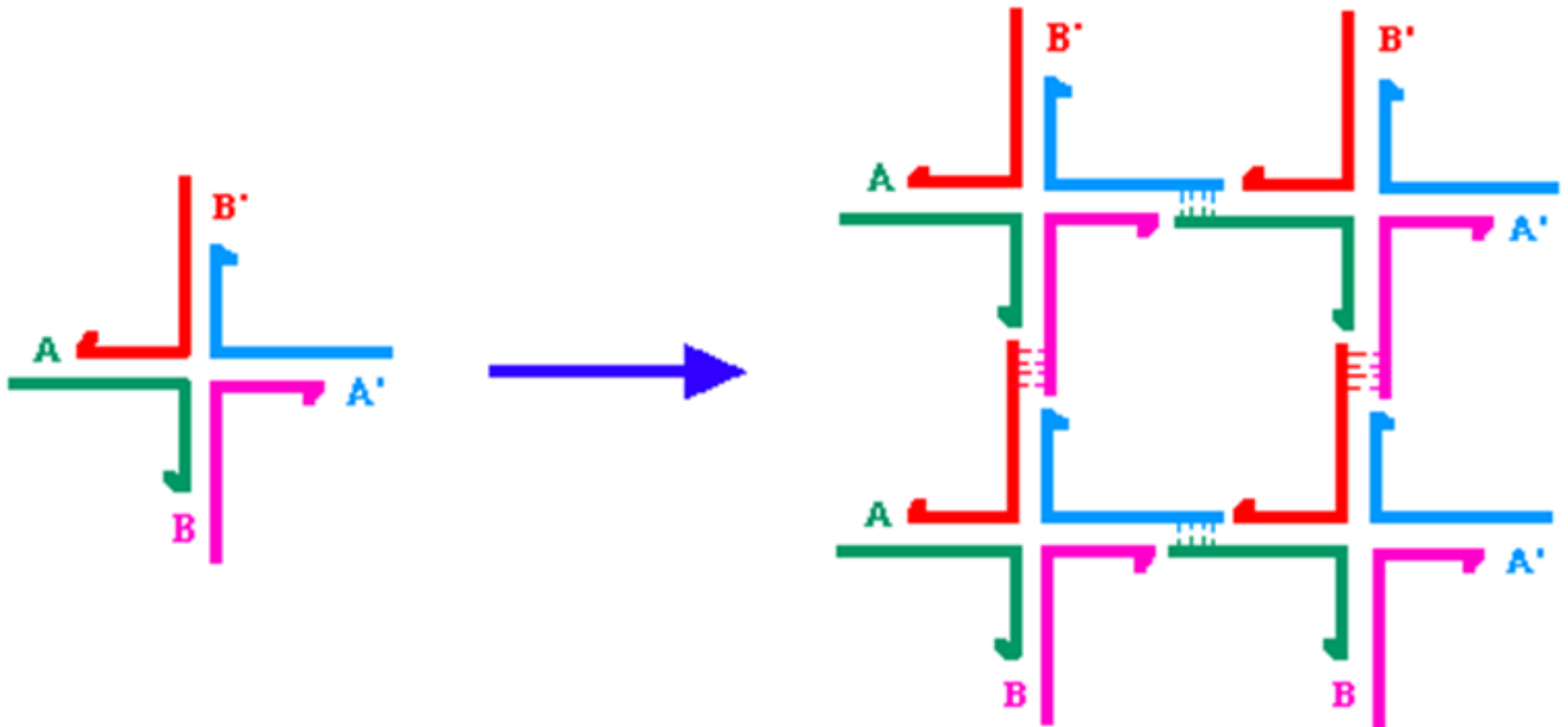
Реакции, осуществляемые дезоксирибозимами

Реакция	Связь	Ускор	Реакция	Связь	Ускор
Гидролиз РНК	O-P	10^8	Реакция Diels-Alder	C-C	4×10^5
Лигирование РНК (3'-5')	O-P	10^5	Депуринизация ДНК	C-N	
Лигирование РНК (ветвление)	O-P	5×10^6	Окислительный разрыв ДНК	C-O	10^6
Лигирование РНК (петля)	O-P	10^5	Фотореактивация тиминовых димеров	C-C	3×10^4
Фосфорилирование ДНК	O-P	10^9	Гидролиз фосфорамидата	N-P	10^3
Аденилирование ДНК	O-P	2×10^{10}	Введение металлов в порфирины	Cu-N	10^3
Лигирование ДНК	O-P	10^5	Нуклеопептидная связь	O-P	5×10^5

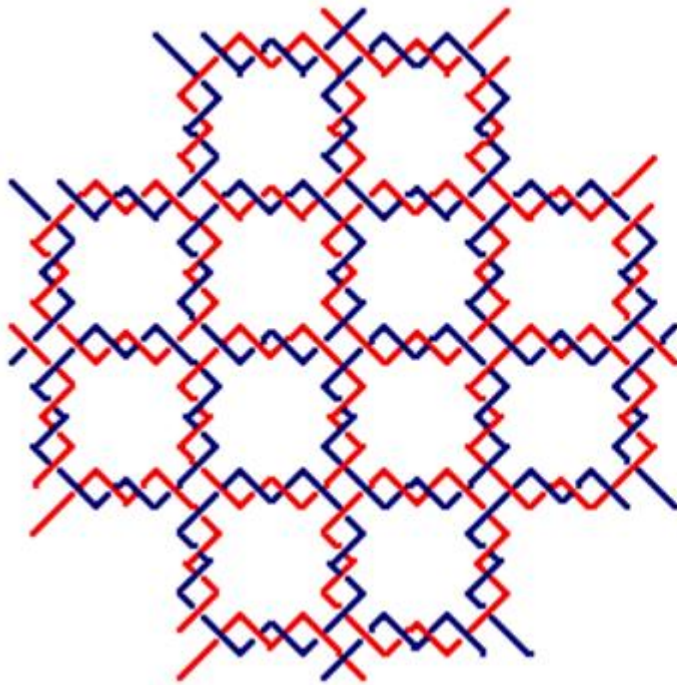
ДНК в наноконструкторе



Образование двумерных решеток из стабильных конструкций с липкими концами

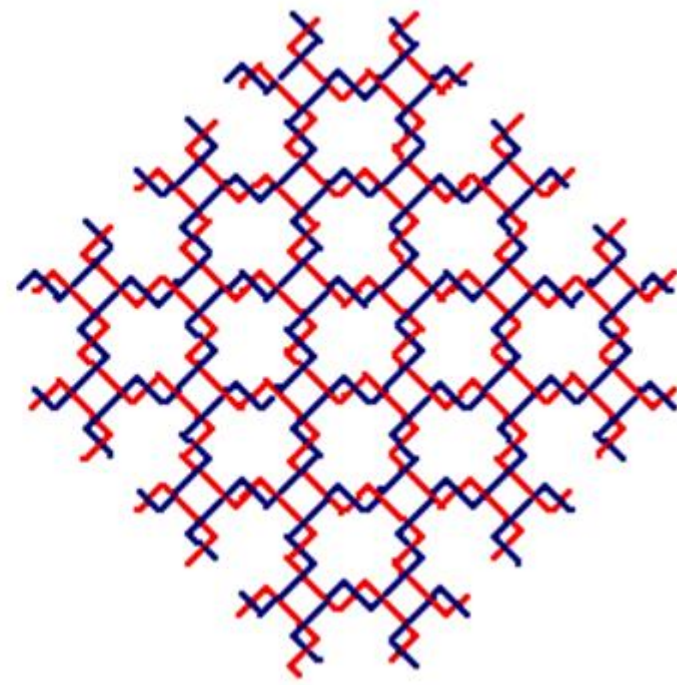


Топологические последствия лигирования молекул ДНК, содержащих четное и нечетное число полувитков на границах ячеек



Нечетное

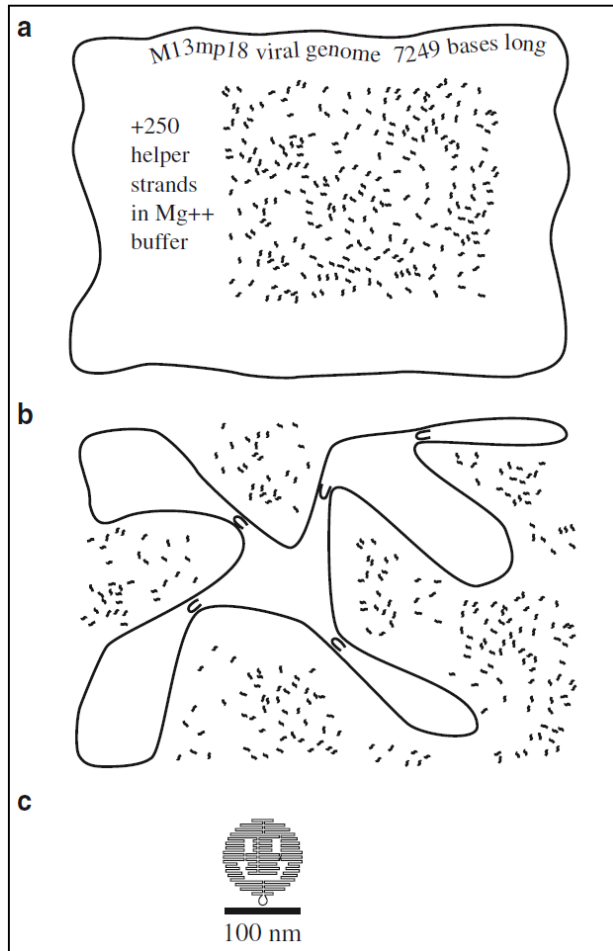
Кольцевые ковалентно
замкнутые молекулы ДНК



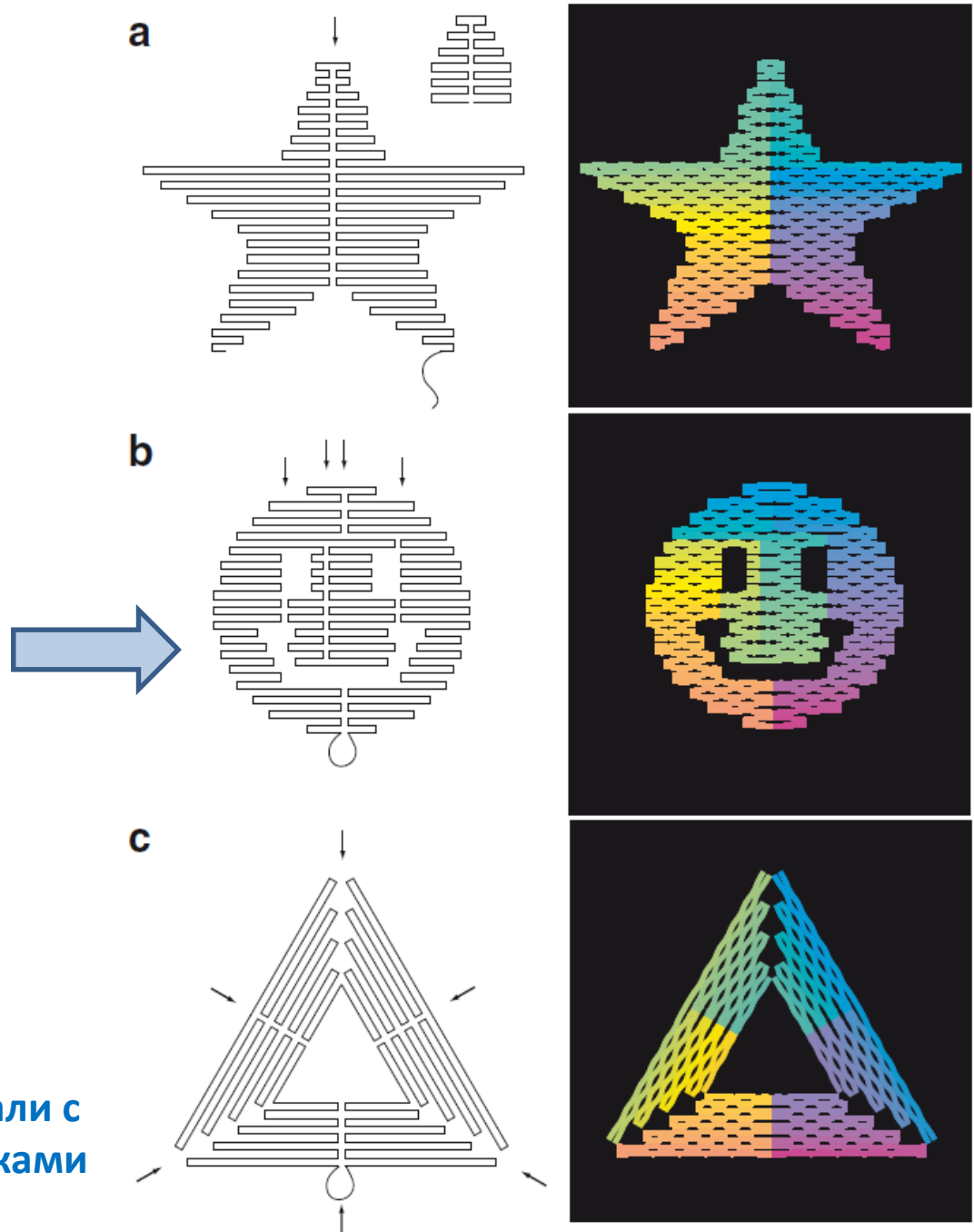
Четное

Линейные молекулы ДНК

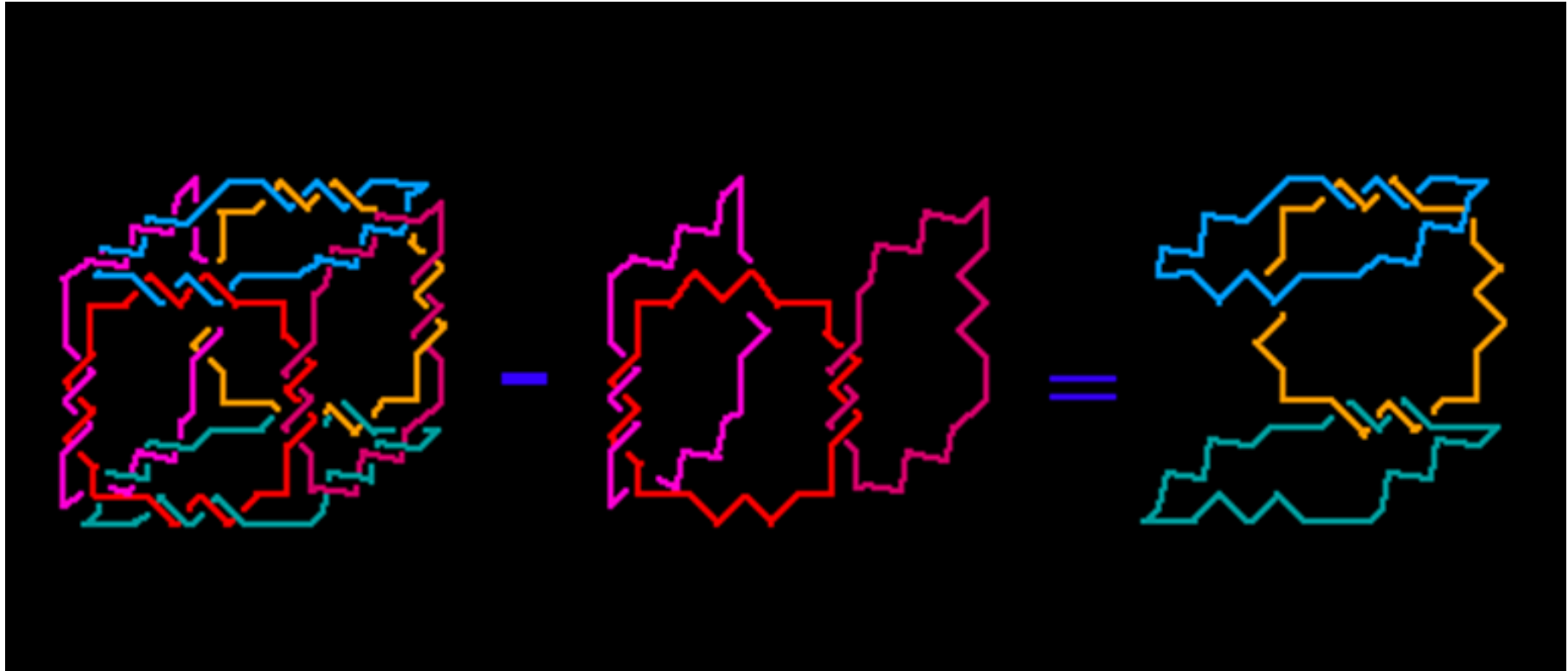
Сложные ДНК-оригами



оцДНК фага М13 (7240 nt) смешивали с 250 олигонуклеотидами-помощниками (32 nt) и охлаждали 2 ч до 20°C

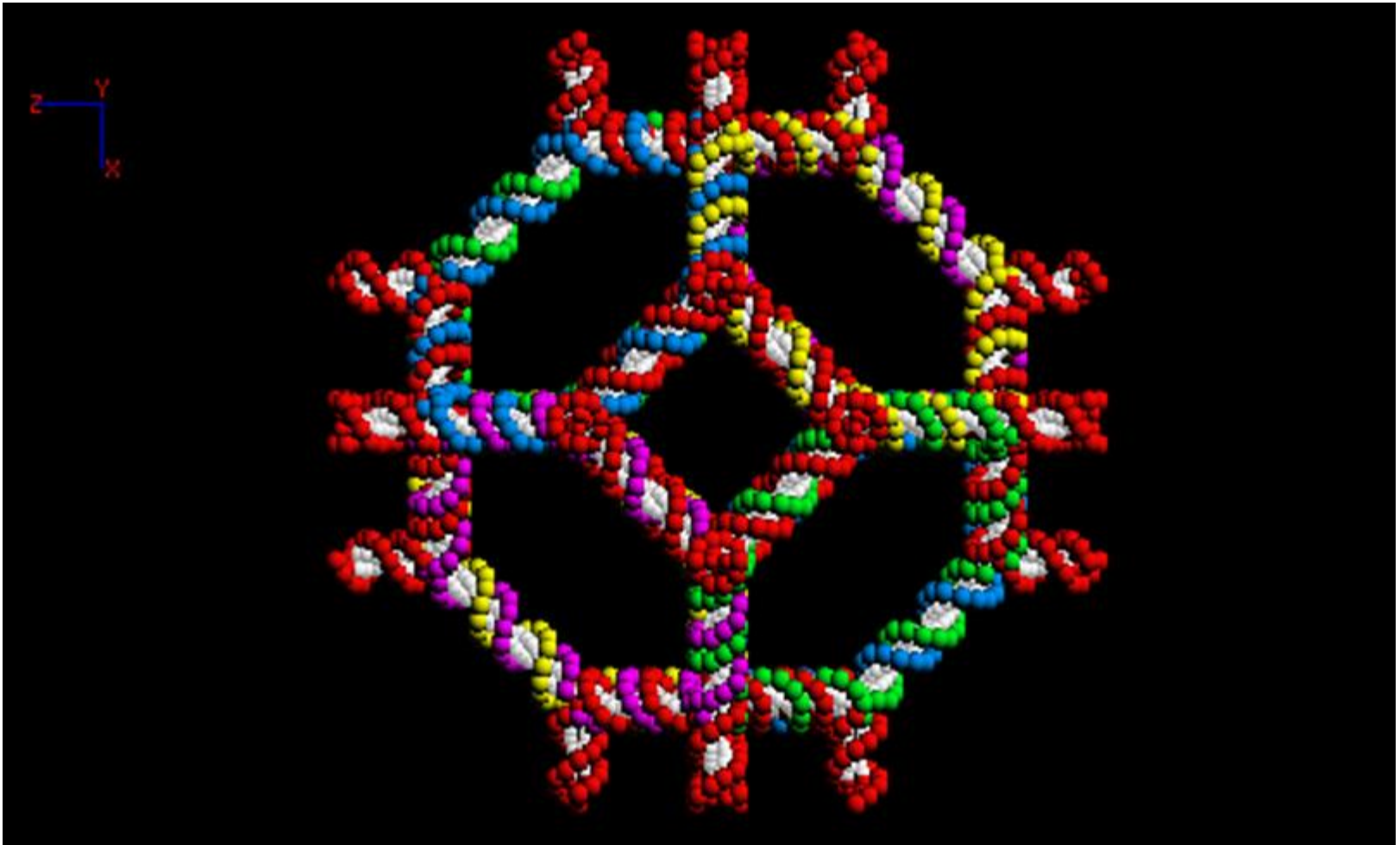


Куб как сумма линейных катенанов ДНК



Линейные тройные катенаны ДНК (в центре рисунка) спонтанно собираются с образованием куба (слева)

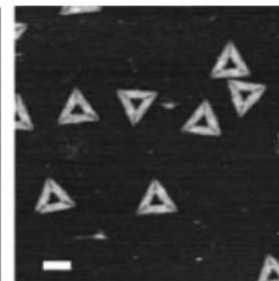
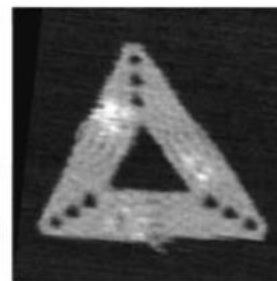
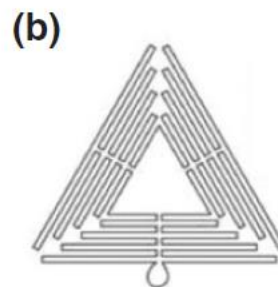
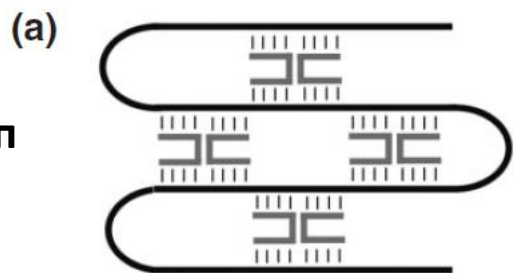
Усеченный октаэдр, построенный из ДНК



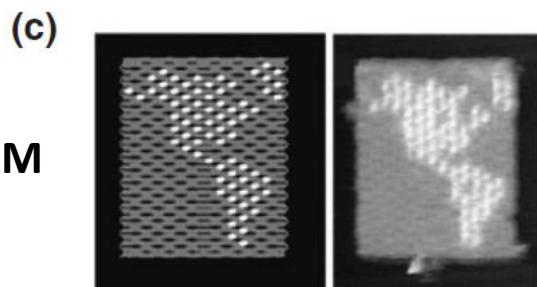
Фигура построена из 14 кольцевых молекул оцДНК. Цветные точки – сахаро-фосфатный остов ДНК, белые точки – азотистые основания. Вид сверху.

Развитие технологии ДНК-оригами

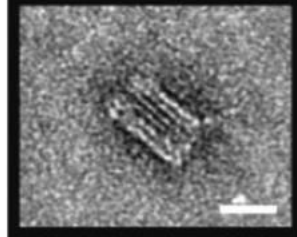
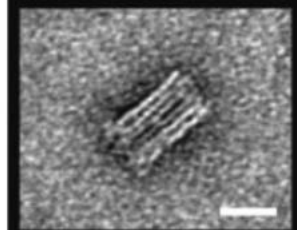
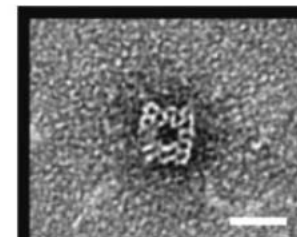
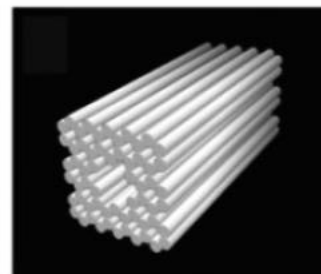
Принцип сборки



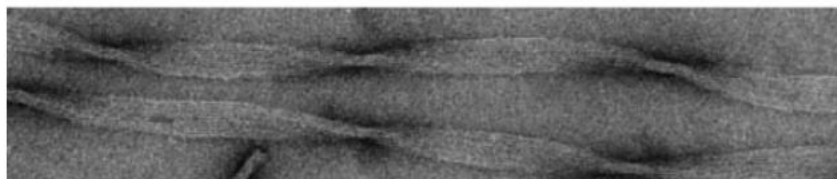
AFM



(d)



TEM



Развитие дизайна ДНК-оригами

