

Искусственный отбор ДНК-аптамеров с 5-метилцитозином

Субач М.Ф., Грабовенко Ф.И., Хренова М.Г., Зверева М.Э.

Студент, 5 курс специалитета

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: maksim.subach@chemistry.msu.ru

Аптамеры – одноцепочечные олигонуклеотиды, способные связываться с определенными мишенями и обладающие высокой аффинностью и специфичностью. SELEX (систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением) представляет собой метод комбинаторной химии, основанный на отборе из библиотеки соединений, специфически взаимодействующих с определенным лигандом путем систематической эволюции. Установлено, что различные модификации способны значительно изменять прочность связывания аптамеров с мишенью. Как правило, модифицируются РНК-аптамеры благодаря наличию 2'-ОН гидроксила, который заменяется на другие заместители, а ДНК-аптамеры реже подвергаются модификации [1]. В данной работе рассмотрено введение пятого основания в ДНК-аптамеры для увеличения разнообразия возможного числа последовательностей и увеличения числа потенциальных гидрофобных взаимодействий ДНК-белок.

В качестве модельной системы выбран RBD-домен (от англ. receptor binding protein) S-белка SARS-CoV-2 (от англ. severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). RBD-домен в составе S-белка связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2, что необходимо для проникновения данного вируса в клетку [2]. В литературе описаны ДНК-аптамеры, которые специфически связываются с доменом RBD S-белка SARS-CoV-2 [3]. Также в нашей лаборатории уже отработана система оценки прочности связывания аптамеров с мишенью с помощью метода бислойной интерферометрии, что использовалось для оценки константы диссоциации комплекса аптамера и белка RBD [4].

В нашей работе была предложена не использованная ранее схема SELEX, которая отличается от традиционного отбора аптамеров введением 5-метилцитозина как пятого основания отдельной энзиматической реакцией после амплификации. В данном подходе к получению аптамеров присутствует один дополнительный шаг, который представляет собой метилирование ДНК библиотек с помощью метилтрансферазы SSSI, модифицирующей CpG-сайты. Был проведен 1 раунд селекции, включающий в себя метилирование исходных библиотек ДНК, разделение двух цепей для получения одноцепочечной ДНК, инкубацию с белком-мишенью RBD в Ni-NTA смоле и отбор наиболее прочно взаимодействующих аптамеров. После отбора проведен анализ полученных последовательностей нанопоровым секвенированием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 23-Ш04-45).

Литература

1. Chen Z. et al. Chemically modified aptamers for improving binding affinity to the target proteins via enhanced non-covalent bonding // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023. Vol. 11. P. 1091809.
2. Song Y. et al. Discovery of aptamers targeting the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // *Analytical chemistry*. 2020. Vol. 92. №. 14. P. 9895-9900.
3. Yao H. et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus // *Cell*. 2020. Vol. 183. №. 3. P. 730-738. E13.
4. Grabovenko F. et al. Glycosylation of receptor binding domain of SARS-CoV-2 S-protein influences on binding to immobilized DNA aptamers // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. №. 1. P. 557.