



# Пептидные конъюгаты олигонуклеотидов для доставки направляющих РНК в клетку

Данилин Н.А.,<sup>1,2,3</sup> Мещанинова М.И.,<sup>1,3</sup> Новопашина Д.С.<sup>1,3</sup>

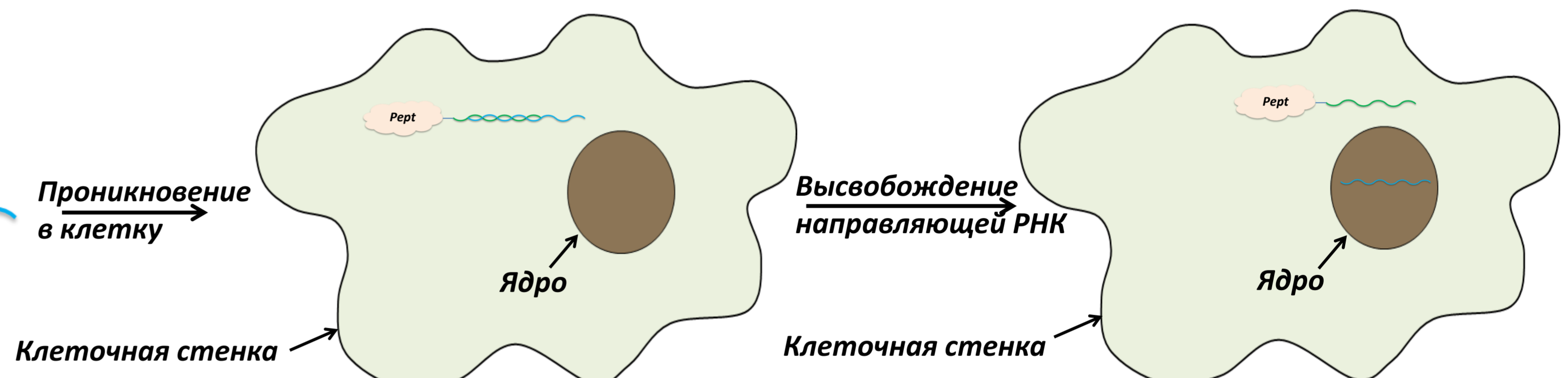
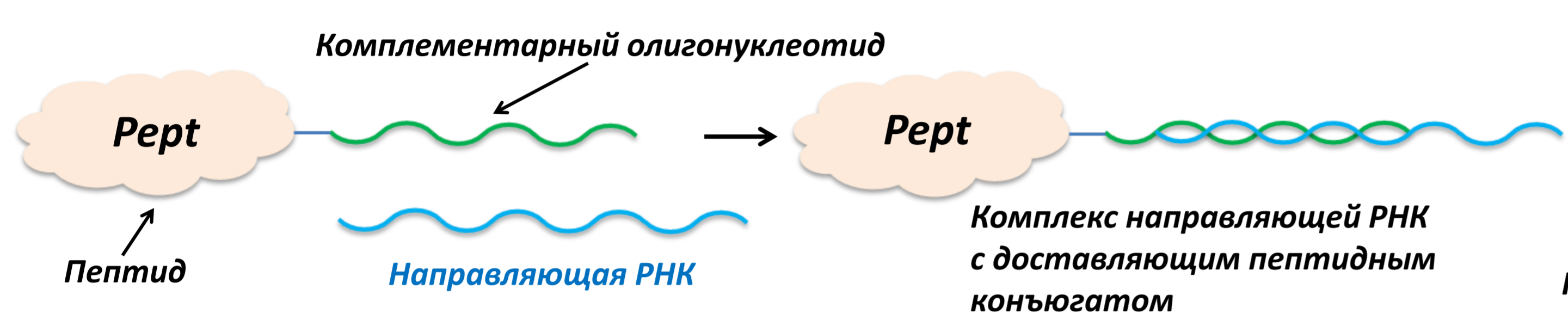
<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

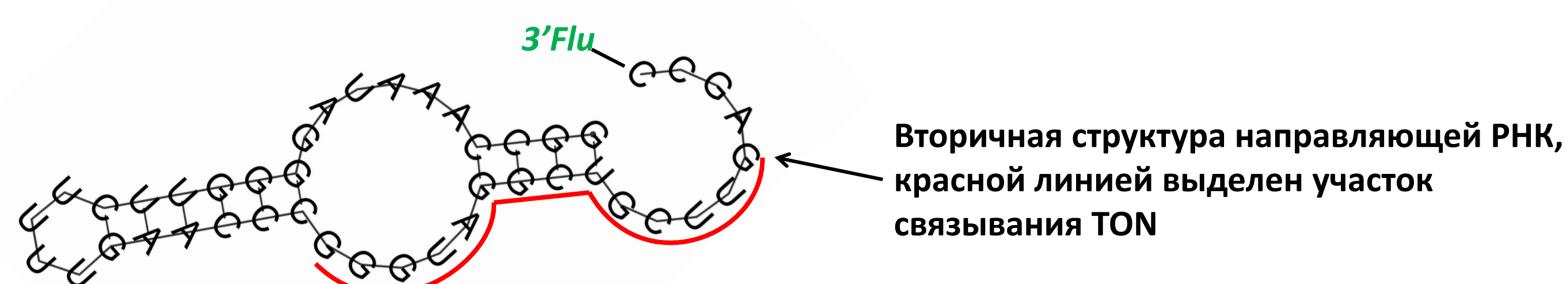
Доставка олигонуклеотидных конструкций в клетки является необходимым условием для решения многих задач молекулярной биологии и медицины. В связи с этим актуальной является разработка подходов к доставке направляющих РНК для системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. В качестве подхода к решению проблемы доставки было предложено использовать конъюгаты олигонуклеотидов с проникающими пептидами.

## Доставляющий пептидный конъюгат



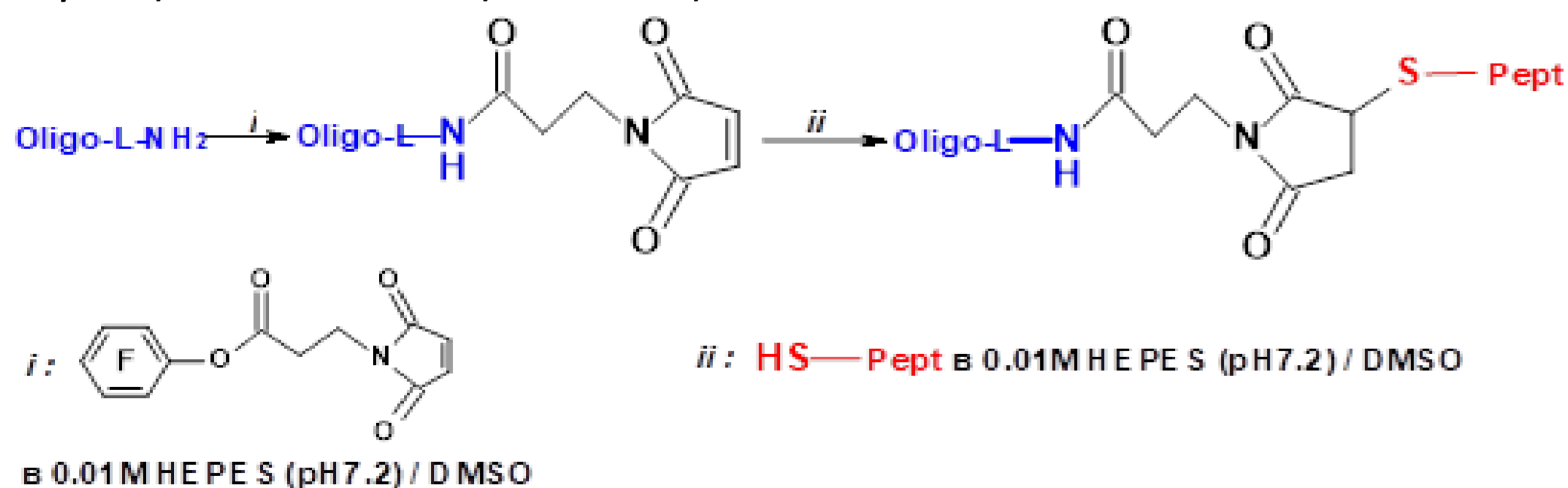
Целью работы было создание олигонуклеотидов, комплементарных доставляемой РНК и содержащих пептиды, способствующие эффективному проникновению олигонуклеотидов в клетки, и исследование способности пептидных конъюгатов формировать прочные комплексы с доставляемой РНК.

Автоматическим фосфитамидным методом в оптимизированных условиях нами были получены направляющий олигонуклеотид модифицированный флуоресцеином по 3'-концу и комплементарный доставляющий олигонуклеотид (TON – transporting oligonucleotide).

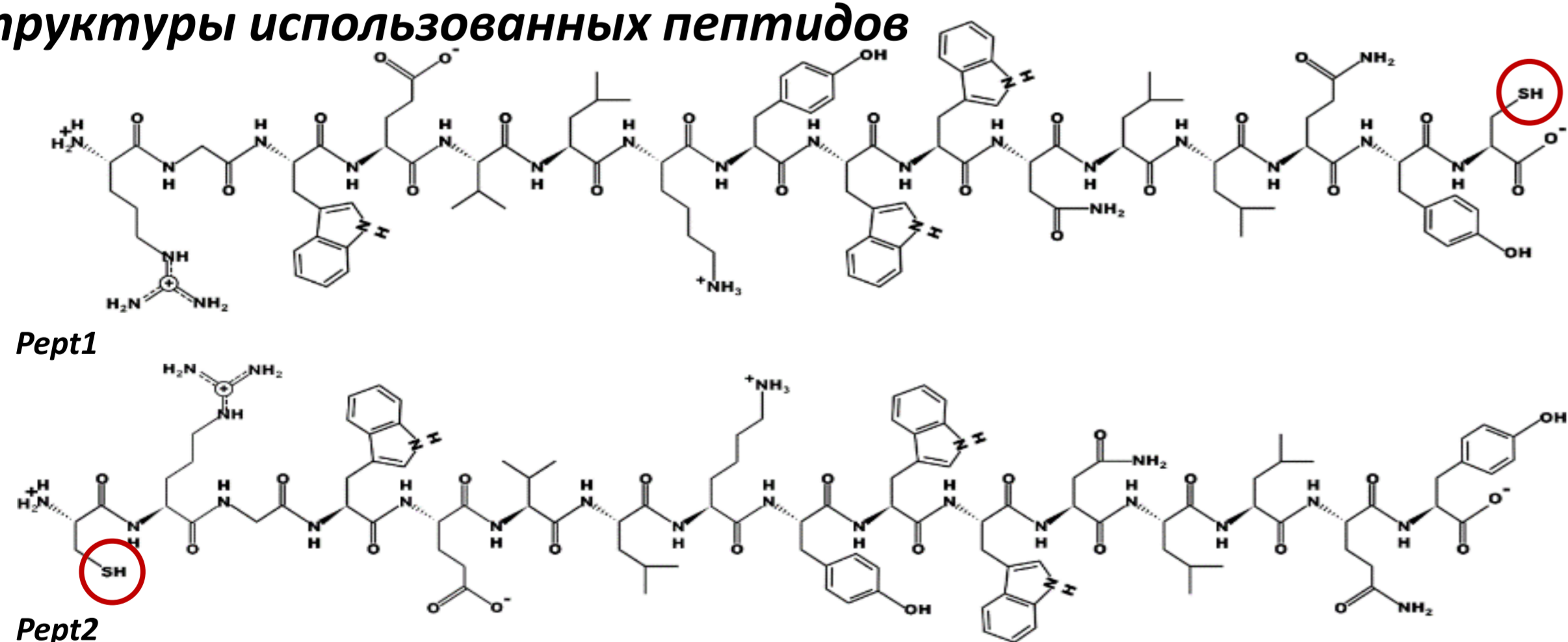


Последовательность 3'-аминомодифицированного олигонуклеотида, комплементарного направляющей РНК (TON)

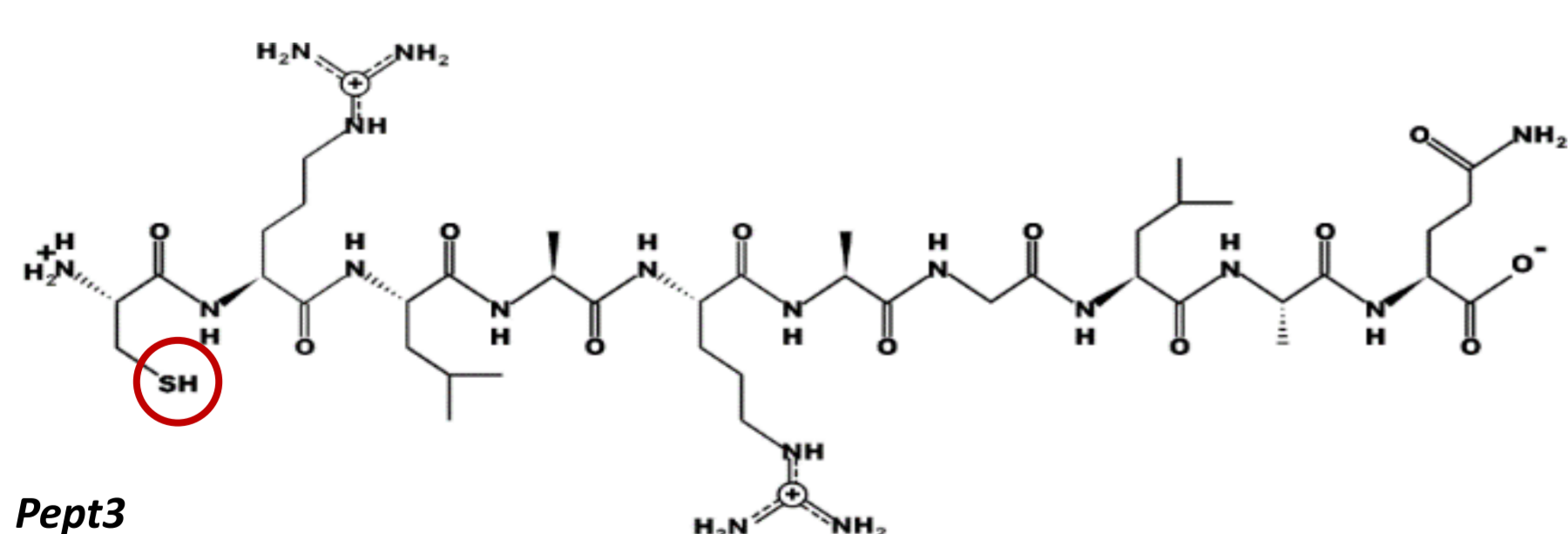
Синтез пептидных конъюгатов был проведен путем введения малеимидной группировки в 3'-аминосодержащие олигонуклеотиды с последующим взаимодействием с пептидом, содержащим на N- или C-конце остаток цистеина.



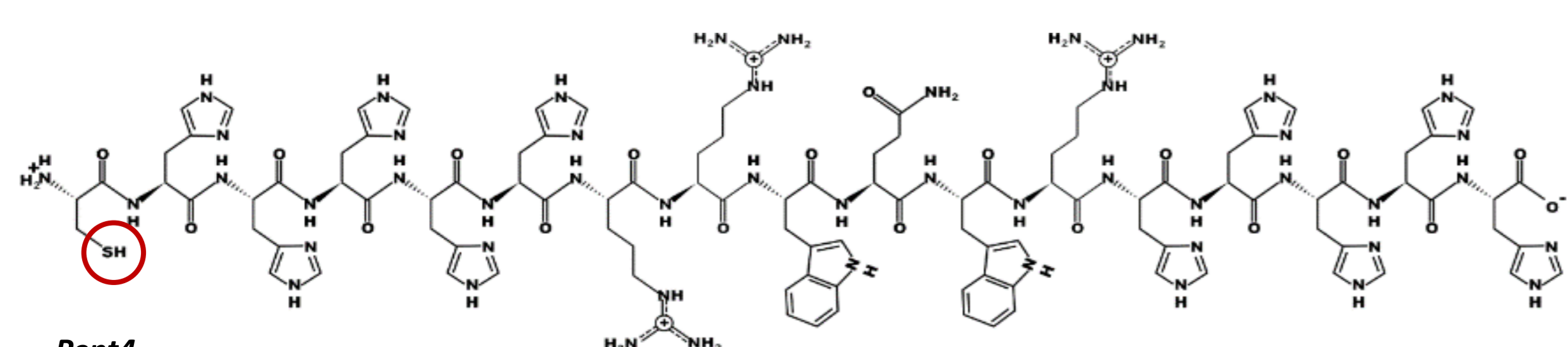
## Структуры использованных пептидов



Kwon, E. J., Liong, S., & Pun, S. H. A truncated HGP peptide sequence that retains endosomal activity and improves gene delivery efficiencies. *Molecular pharmaceutics* 2010, 7, 1260.



Urszula Zlotek, Anna Jakubczyk, Kamila Rybczynska-Tkaczyk, Paula Cwiek, Barbara Baraniak and Sławomir Lewicki. Characteristics of New Peptides GQLGEHGGAGMG, GEHGGAGMGGGQFPV, EQGFLPGPEESGR, RLARAGLAQ, YGNPVGVG, and GNPVGVGHTTGT as Inhibitors of Enzymes Involved in Metabolic Syndrome and Antimicrobial Potential. *Molecules* 2020, 25, 2492



Han-Jung Lee, Yue-Wern Huang, Shioh-Her Chiou, Robert S. Aronstam. Polyhistidine facilitates direct membrane translocation of cell penetrating peptides into cells. *Scientific reports* 2019, 9, 1.

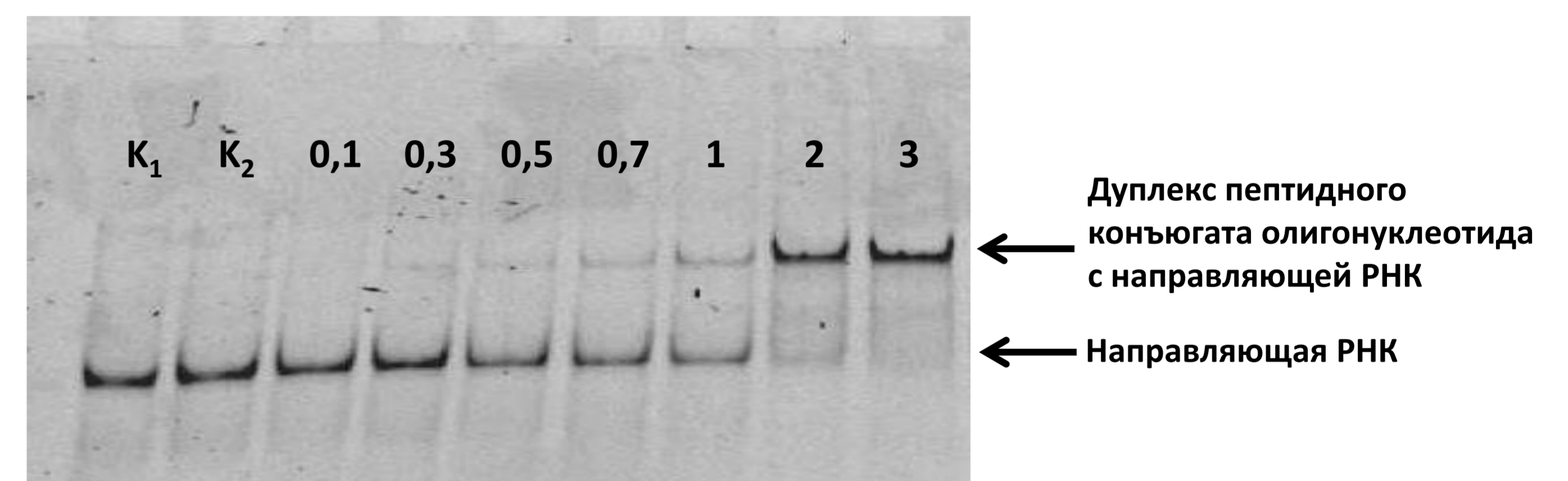
## Заряды пептидов при различных pH

Шифр	Последовательность	Изоэлектрическая точка	pH=5,5 (Лизосома)	pH=7,4 (Цитоплазма)	pH=8,0 (Митохондрия)
Pept1	RGWEVLKYWWNLLQYC	8,13	1,1	0,5	0,1
Pept2	CRGWEVLKYWWNLLQY	8,13	1,1	0,5	0,1
Pept3	CRLARAGLAQ	10,32	2,0	1,6	1,2
Pept4	CHHHHHRRWQWRHHHHH	11,54	8,8	2,7	2,2

Данные получены с использованием сайта <http://isoelectric.org/>

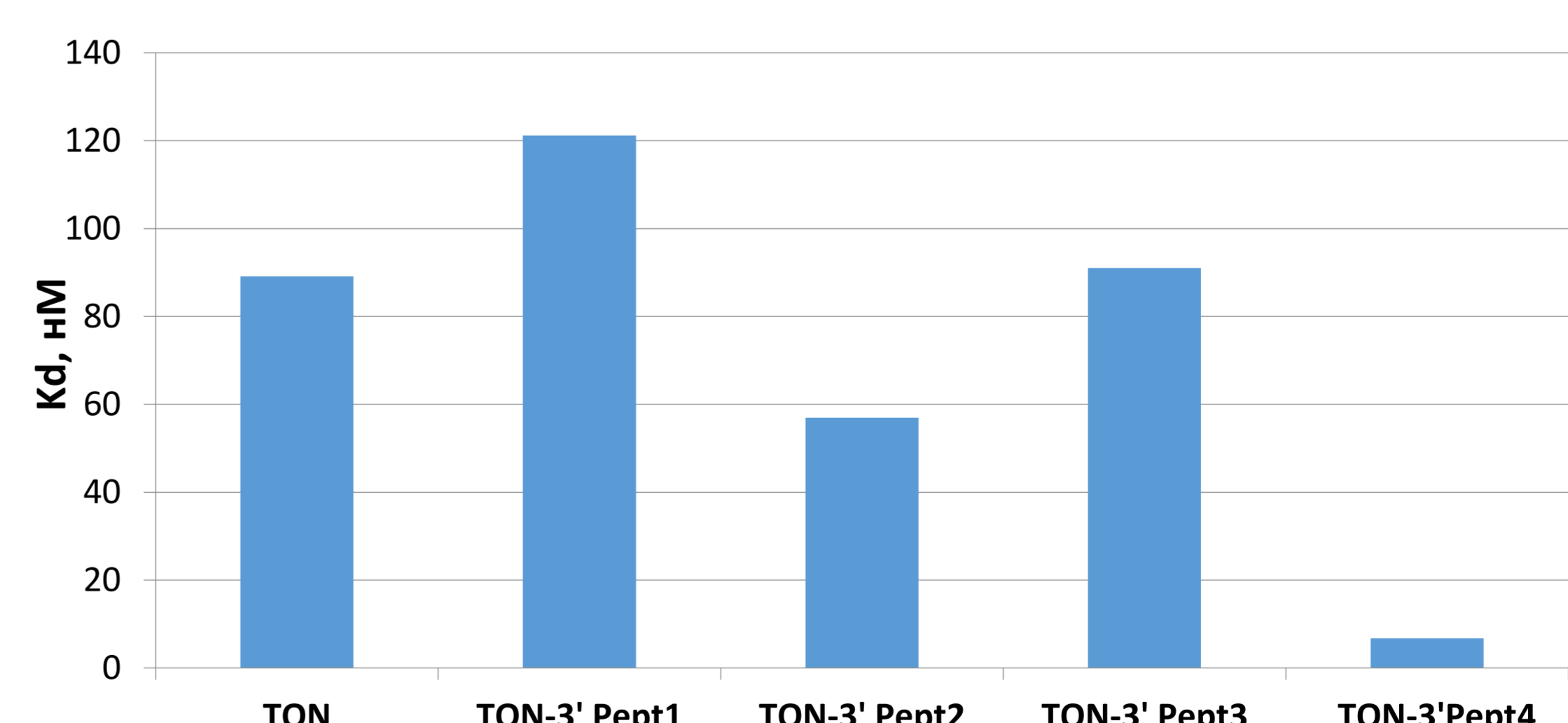
## Стабильность комплексов пептидных конъюгатов олигонуклеотидов с направляющей РНК

Методом задержки в геле с визуализацией по флуоресценции остатка флуоресцеина, введенного на 3'-конец направляющей РНК была исследована стабильность комплексов пептидных конъюгатов с этой РНК и контрольного олигонуклеотида, не содержащего пептида.



Анализ образования дуплекса пептидного конъюгата TON-3'Pept1 с флуоресцентно меченой направляющей РНК методом задержки в геле. Анализ проводили в 15%-ном нативном ПААГ. Условия реакции: 1 мкМ РНК-мишень, пептидный конъюгат с конц. 0,1 – 3 мкМ, 10 мМ Трис-НСI, pH 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 37 °С. Дорожка K1 – РНК-мишень без отжига; K2 – РНК-мишень (2 мин, t = 95 °С); дорожки 0,1 - 3 – комплексы, образующиеся в присутствии пептидного конъюгата, в соответствующей концентрации (мкМ).

## Константы диссоциации комплексов пептидных конъюгатов олигонуклеотидов с направляющей РНК



В большинстве случаев пептиды слабо влияли на стабильность комплекса комплементарного олигонуклеотида с направляющей РНК, только в случае конъюгата с Pept4 происходило значительное увеличение сродства к РНК. Константа диссоциации комплекса этого конъюгата с направляющей РНК была на порядок меньше, чем для остальных конъюгатов и контрольного олигонуклеотида. Такой эффект может быть связан с наибольшим положительным зарядом этого пептида в условиях проведения исследования.

Таким образом, нами синтезированы пептидные конъюгаты олигонуклеотидов, способные формировать прочные комплексы с направляющими РНК, которые могут быть в дальнейшем использованы для доставки РНК в клетки и эффективной работы системы геномного редактирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-34-51026 «Научное наставничество».