

as a manuscript

El-Deeb Ahmed Abdelkader Mohamed Othman

**RECOGNITION OF NUCLEIC ACIDS USING MULTICOMPONENT DNA
NANOCONSTRUCTS**

1.5.4. Biochemistry

AUTOREFERAT

of the dissertation for the degree of
Candidate of Biological Sciences

Moscow – 2025

The work was carried out in the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "ITMO National Research University".

Scientific supervisor: **Dmitry Mikhailovich Kolpashchikov**,
PhD of Chemical Sciences, professor
of the Chemistry Department and Burnett School of
Biomedical Sciences, University of Central Florida, USA

Official opponents: **Dmitry Alexandrovich Gryadunov**
Doctor of Biological Sciences,
Chief Researcher, Head of the Laboratory of Molecular
Diagnostics Technologies at the Federal State Budgetary
Institution of Science, Institute of Molecular Biology of the
Russian Academy of Sciences (IMB RAS)

Artem Nikolaevich Bonchuk
Doctor of Biological Sciences,
Senior Researcher at the Federal State Budgetary Educational
Institution, Institute of Biology and Genetics of the Russian
Academy of Sciences (IBG RAS)

The leading organization: Federal State Budgetary Institution of Science,
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ministry of Health of the Russian Federation

The defence will take place on April 30, 2025 a meeting of the dissertation council of the PDS 0300.025 at FGAOU HE "Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba" (RUDN), address: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya Street, 6.

The dissertation can be accessed in the reading room of the UNIBC (Scientific Library) of the Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN), address: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya Street, 6.

The electronic versions of the dissertation and abstract are available on the RUDN website at: <https://www.rudn.ru/science/dissovet> and have been sent for publication on the official website of the Higher Attestation Commission at the Ministry of Education and Science of Russia: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Abstract sent out on _____ 2025

Scientific Secretary
of the Dissertation Council of PDS 0300.025
Doctor of Biological Sciences, Professor

E.V. Lukasheva

GENERAL CHARACTERIZATION OF WORK

Actuality of the research topic. Hybridization of nucleic acid probes to RNA is used in diagnosis and therapy. This approach leverages the intrinsic properties of nucleic acids to recognize and bind to specific sequences, enabling the development of targeted therapeutic and specific and sensitive diagnostic tools. This work applies the approaches of DNA nanotechnology in the design of a new generation of hybridization probes for applications in the two key areas: treating and diagnosing human diseases.

DNA hybridization probes have emerged as powerful tools for both diagnostics and therapy, leveraging their ability to selectively bind to specific nucleic acid sequences (Kolpashchikov, 2019). These probes offer high specificity and can be designed to recognize genetic disease markers, making them invaluable in analysis and therapy of human diseases (Gerasimova and Kolpashchikov, 2010). It was demonstrated earlier that using multiple hybridization probes (elements) can improve selectivity, sensitivity and multiplexing capability of hybridization-based approaches (Gerasimova et al., 2010). These functional elements can be combined in a single nanostructure called ‘DNA Constructs’, with improved cooperativity in recognition of DNA and RNA (Nedorezova et al., 2019). It was hypothesized that hybridization probes and DNA Constructs are evolving in DNA nanorobots, possessing the following four functions: (i) sensing for recognition of disease markers, (ii) computation for analysis multiple markers, (iii) actuation that can accomplish therapeutic treatment, and (iv) auto delivery (Wang et al., 2022). This study is devoted to advancing sensing and computation functions of the DNA nanorobot.

The study takes advantage of the earlier developed hybridization sensor based on RNA-cleaving DNzyme (Dz). The sensor, named ‘binary Dz’ or biDz can bind specific nucleic sequences followed by activation of RNA cleaving function, which can be translated in a fluorescent signal for sensing. The biDz sensor can be equipped with multiple recognition sites for binding several different nucleic acid analytes. The analyte is a disease marker that will activate the DNA construct once it is detected. In this work, DNA Constructs based on biDz was adopted to (i) differentiation low from high

concentrations of cancer marker RNA sequences; (ii) recognition of multiple biomarker sequences; (iii) detecting low concentrations of viral RNA in amplification free format.

Degree of development of the research topic. Research in the development of DNA nanorobots with integrated sensing and computational modules aimed at disease diagnostics and therapy is currently in an active stage of advancement. In recent years, significant attention has been directed toward the creation of DNA structures capable of performing complex logical operations at the molecular level, opening new horizons for the application of DNA nanotechnology in biomedicine. Research in DNA nanotechnology is also focused on the development of oligonucleotides that, once they bind to the target, trigger RNA cleavage, such as antisense oligonucleotides (ASOs) (Bartolucci et al., 2022) or RNA-cleaving DNazymes (Chaput et al., 2023). However, techniques that lack input activation-based control and target selection, since they mainly target oncogenes and do not kill the cancer cell directly, still face the problem of being activated in healthy cells, which can lead to deadly side effects.

DNA nanomachines capable of simultaneously performing multiple tasks, including detection and RNA cleavage, such as those developed by (Drozd et al., 2020; Nedorezova et al., 2019), address the activation control problem and suggest targeting housekeeping genes to cause toxicity in unhealthy cells. However, the detection of biomarkers, especially folded RNA molecules, can be a significant challenge. Moreover, detecting one input may be useful in the case of viral diseases, but in other complex diseases, such as cancer, multiple markers are needed to determine whether a cell is healthy. Thus, a critical task is the development and optimization of algorithms for signal recognition and processing.

DNA logic gates proposed by Khanum et al. (2020), including YES, 2I AND, and 3I AND gates based on DNazymes, lack the ability to connect the logic gate elements within one structure, which remains an obstacle in developing a DNA processor to analyze the algorithms. Furthermore, there is a need to design DNA logic gates that activate or inhibit based on cancer-related markers.

Despite significant progress in this area, questions remain regarding the integration of various modules into a single system, the sensitivity of constructs, and the

minimization of side effects associated with their use in the body. Active research is also ongoing on the development of new mechanisms for the regulation and activation of DNA nanorobots, including the use of antisense and DNAzyme strategies and new types of logic elements.

Aims and Objectives:

The aim of this dissertation is to develop multicomponent DNA constructs and investigate their sensitivity threshold for analyte detection with the purpose of applying them in the diagnosis of human diseases, as well as to evaluate the ability of these constructs to induce biomarker-dependent cleavage of RNA targets in a therapeutic context. To achieve these aims, the following tasks were pursued:

1. Develop DNA constructs based on binary DNAzymes (biDz) and antisense oligonucleotides (ASO) to achieve in vitro cleavage of RNA targets in the presence of low and high concentrations of oncogenic microRNAs.

2. Develop DNA constructs based on biDz, operating on the principle of logic gates and incorporating a universal DNA scaffold that unites all functional components of the DNA constructs into a single complex, to achieve inhibition or activation of substrate cleavage in the presence of various combinations of oncogenic or tumor-suppressive microRNAs.

3. Develop DNA constructs based on biDz to achieve a reduction in the limit of detection (LOD) of analytes by adding to the DNA constructs: a) additional analyte-binding sites; b) a fluorogenic substrate delivery function; c) an increased number of catalytic centers.

Scientific novelty and practical significance of the work. For the first time, cleavage of specific RNA target was achieved in the presence of low and high concentrations of as miR-17 and miR-92. The threshold concentration that triggers construct activating can be fine-tuned by changing the number of recognition modules in DNA Constructs. For the first time, DNA logic gates with YES, 2AND, 3AND, 2iINHIBIT, and 3iINHIBIT Boolean logic functions were integrated to a single DNA scaffold. These gates enabled RNA cleavage through different combinations of miR-15, miR-17, and miR-21, with specific signal-to-background ratios. For the 1st time it was

demonstrated that addition of RNA binding arms, Substrate delivery and additional substrate cleaving functions to DNA Construct significantly reduces LOD of RNA extracted from infected cells.

Value of the scientific work. The results advance the field of DNA nanotechnology toward application in diagnosis and treatment of human diseases. The developed DNA -constructs recognize concentrations and patterns of nucleic acid analytes autonomously without involvement of a human operator, which create a basis for development of DNA nanorobot by analysis for distinguishing healthy from non-healthy cells. The PCR-free detection of low RNA concentration creates a bases for the development of highly sensitive sensing modules of DNA nanorobots and could be used in PCR-free diagnostics of human infectious diseases.

Object and subject of the study. The object of the study is multicomponent hybridization probes - DNA Constructs. The subject of the study is the DNA Constructs' sensitivity for RNA analyte detection and target RNA cleavage activity in the presence of high concentrations or specific combinations of cancer markers.

Research methodology and methods. The chosen RNA targets included fragments of GFP RNA (RNA-60) and DAD-1 RNA (RNA-46), for the convent monitoring of gene suppression in further cell culture experiments, and viral RNA SARS-CoV-2, due to its significant global health threat posed by high mutation rates of RNA viruses. Specific miRNAs, such as miR-15-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-7d-let, miR-92a-1 (miR-15, miR-17, miR-21, miR-7, miR-92), were selected as cancer markers because of their elevated expression levels in various cancers, providing a relevant and challenging target for DNA-based probes. The main research methods included polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and fluorescence-based quantitative analysis of RNA cleavage products and statistical analysis of the results.

Provisions for defense:

1. *In vitro* RNA cleavage can be achieved only at high but not low concentrations of cancer markers by adding more marker binding sites to the biDz-based DNA Constructs.

2. *In vitro* RNA cleavage can be achieved only at high but not low concentrations of cancer markers by adding more marker binding sites to the ASO-based DNA Constructs.

3. Logic gate DNA Constructs containing all functional elements as part of a single DNA association can cleave target RNA only in the presence of a selected set of microRNA cancer markers that corresponds to behaviour of AND and INHIBIT Boolean logic operations.

4. Addition of RNA binding arms to biDz-based DNA Constructs decreases limit of detection (LOD) for detection of viral DNA and RNA analytes folded in stable secondary structures.

5. Addition fluorogenic substrate delivery function to biDz-based DNA Constructs decreases limit of detection (LOD) for detection of viral DNA and RNA analytes.

6. BiDz-based DNA Construct equipped with multiple RNA cleaving cores demonstrates less LOD for detection of viral DNA and RNA analytes in comparison with biDz sensor having single catalytic core.

Credibility of scientific achievements. To ensure and confirm the high degree of reliability in the work used a set of modern experimental methods of research, statistics. Scientific provisions, conclusions and recommendations are based on the analysis of a huge amount of scientific literature and confirmed by experimental data.

Research approbation. The results of the work are presented in 18 publications (articles, abstracts) - 7 of articles are included in the Scopus and Web of Science citation bases, 11 theses presented at 9 All-Russian and international conferences.

The work was supported by ITMO University's Priority 2030 Development Strategy (No.922017) and PISH ITMO (No.92145).

Compliance of the topic with the requirements of the passport of specialty VAK. The work was carried out within the framework of the specialty passport 1.5.4 - Biochemistry: p.11 "Investigation of problems of recognition at the molecular level, storage and transfer of information in biological systems."

Structure and scope of the thesis. The dissertation consists of an introduction, literature review, description of materials and methods used in the work, description of the research results, discussion of the obtained results, conclusions, as well as a list of used sources. The text of the dissertation is outlined on 154 printed pages, illustrated with 72 figures and 10 tables, The list of references contains 168 literature sources. The dissertation is outlined in accordance with the general requirements for the design of candidate and doctoral dissertations, approved in GOST R 7.0.11-2011.

Author's personal contribution: The author's individual contribution to this research consists of conducting a thorough literature review, designing DNazymes and DNA machines DNA Constructs and carrying out the experiments described in the thesis. The author was solely or directly involved in obtaining all the results presented in this work. The author personally analysed and interpreted the data using statistical methods, described the results, and discussed the findings and conclusions with their scientific supervisors and co-authors during the preparation of publications.

MAIN CONTENT OF WORK

Chapter 2. Materials and methods

Experimental procedures. *Prediction of secondary structure.* The secondary structure of RNA fragments and their thermodynamic parameters were determined with the RNA Folding Form Application of the MFold server. Melting temperatures between RNA-binding domains and RNA targets were calculated using the Hybridization of two Different Strands of DNA or RNA application of the DNAMelt MFold server. The energetic parameters were chosen according to the experimental conditions: DNA/DNA hybridization at 37°C, [Na⁺] = 165 mM, [Mg²⁺] = 2 mM and chain concentrations: RNA = 1 μM, DNAzyme/ASO = 0.003 - 0.1 μM.

Measurement of oligonucleotide concentrations. The synthesised oligonucleotides were diluted with Nuclease free water to a concentration of ~ 100 μM. Several dilutions were prepared from the stock and actual concentration measured using a NanoPhotometer at wavelength 260 nm (the extinction coefficient was calculated by the device automatically when the sequence was entered).

Assembly of DNA Constructs. Equimolar concentrations of different machine components were mixed in Reaction Buffer (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 15 mM NaCl and 2 mM MgCl₂), transferred to a 500 mL beaker filled with prtiçe boiled water and then allowed to gradually cool down to room temperature overnight. DNA constructs assembly was verified by electrophoresis (native PAGE or agarose) and stained (Gel red, SYBR Gold or ethidium bromide) for visualisation.

DNAzyme based fluorescent assay. Synthetic substrate (F_{sub}) labelled with a fluorophore (FAM) and a quencher (BHQ-1) were used as a cleavage substrate. The quencher absorbs fluorescence when the substrate is intact. When the substrate binds to a DNA construct and is cleaved, the quencher dissociates, allowing fluorescence to be measured. The substrate, DNA constructs, and inputs (RNA or DNA) were incubated in a reaction buffer with an appropriate amount of magnesium ions 50, 10 and 200 mM at 37°C and 55°C. The resulting fluorescence was measured using the TECAN spectrophotometer at specific wavelengths 480-525 nm.

DNAzyme based RNA cleavage assay. DNA constructs were modified to bind and cleave a fluorescent RNA substrate, demonstrating adaptability. The RNA substrate, DNA constructs, and inputs were incubated in a reaction buffer with 2mM amount of magnesium ions at 37°C for 7-24 h. The sample was denatured at 95°C for 5 min, cooled on ice for 5 minutes and loaded onto denaturing PAGE. Gels were visualised using the ChemiDoc Touch Imaging System and the cleavage analysed.

RNase H dependent RNA cleavage assay. DNA constructs were designed to bind and cleave a fluorescent-labelled RNA. The RNA substrate, DNA constructs, varying concentrations of input (miR-17) along with recombinant RNase H were incubated in a reaction buffer at 37°C for 20 min. The sample was denatured at 95°C for 5 min, cooled on ice for 5 minutes and loaded onto denaturing PAGE. Gels were visualised using the ChemiDoc Touch Imaging System and the cleavage analysed.

Chapter 3. Results and discussion

Molecular computation. Three logic gate DNA Constructs were designed (YES, 2i, 3i) to be activated in response to miR-17 molecules. The YES requires one molecule, the 2i requires two, and the 3i requires three. Activation leads to the formation of a catalytic core that cleaves a substrate, producing a fluorescent signal. Peak cleavage activity occurred at 10 nM, 20 nM, and 30 nM miR-17 concentrations for the YES, 2i, and 3i (Figure 1), with turnover frequency of 8.1 h⁻¹, 9.8 h⁻¹, and 9.7 h⁻¹, respectively. Selectivity assays confirmed that miR-20 produced no activation, demonstrating the DNA Constructs' specificity for miR-17.

The RNA-binding arms of YES, 2i, and 3i were optimized for RNA-46 fragment from the DAD-1 gene. Cleavage activity peaked when the miR-17 input was equal to or exceeded the gate strand concentration (100 nM for YES, 200 nM for 2i, 300 nM for 3i) (Figure 2). However, excessive input reduced activity, highlighting the need for one unit DNA construct to address high concentration and activity drop issues.

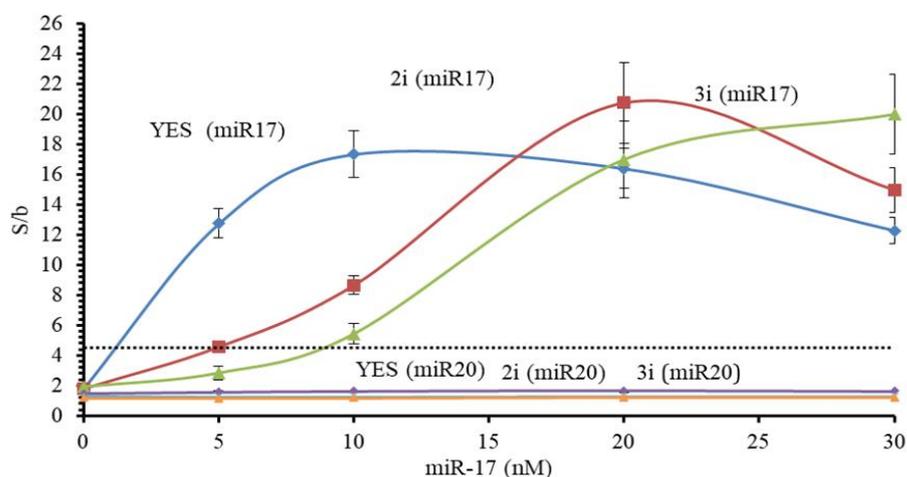


Figure 1. Fluorescence spectrophotometry showing cleavage activity of split threshold DNA Constructs targeting F_{sub} . F_{sub} (200 nM) was incubated with 10 nM of each gate and various concentrations of miR-17 for 1 h at 37°C. Selectivity test for miR-17, showing fluorescent response to increasing miR-17 concentrations (above dashed line; threshold) and two-base mismatched miR-20 (below dashed line).

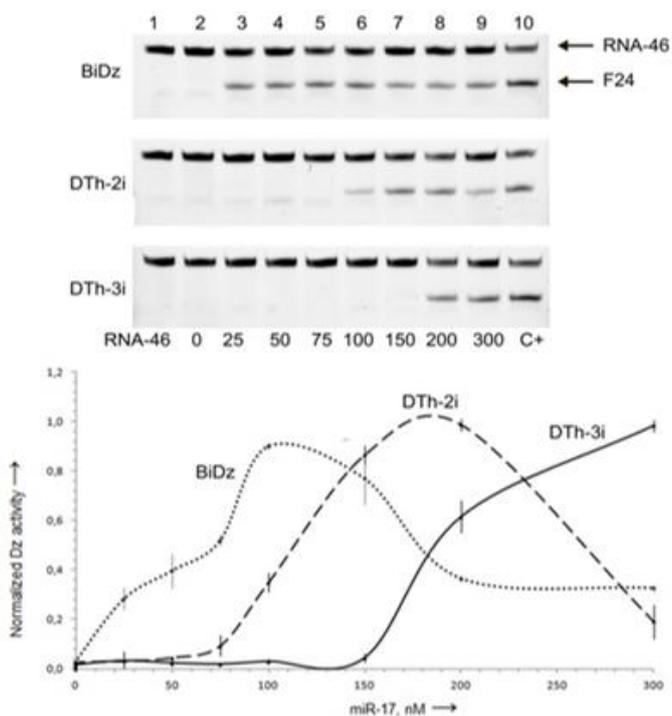


Figure 2. Threshold DNA Construct targeting RNA-46 (1 mM). Reactions incubated at 37°C for 24 h, followed by denaturing PAGE analysis, showed RNA-cleavage peaks for YES-46, 2i-46, and 3i-46 gates (100 nM) with microRNA-17 at 100 nM, 200 nM, and 300 nM, with turnover frequency of 1.17 h^{-1} , 1.28 h^{-1} , and 1.07 h^{-1} , respectively. Cleavage activity decreased beyond input gate ratios of 1:1, 2:1, and 3:1 for YES, 2i-46, and 3i-46.

Cleavage efficiency assessment of the 5-input thresholding split DNAzyme gates targeting F.sub and GFP-RNA 60. Four DNAzyme thresholding gates (2i-DTh, 3i-DTh, 4i-DTh, 5i-DTh) and BiRDz were designed. BiRDz is a binary DNAzyme that cleaves a substrate upon activation by an miR-92 molecule, producing fluorescence. The activation of 2i-DTh, 3i-DTh, 4i-DTh, and 5i-DTh gates require two, three, four, and five miR-92 molecules, respectively, to unwind inhibitory loops and bridge strands, activating the catalytic core to cleave the substrate and emit a fluorescent signal.

Fluorescence was measured after incubation with varying miR-92 concentrations. BiRDz, 2i-DTh, 3i-DTh, and 5i-DTh exhibited hyperbolic fluorescence responses, with peak activation at 10 nM, 25 nM, and 35 nM of miR-92, respectively. 5i-DTh required five miR-92 molecules for activation (Figure 3). The threshold indicated activation at 1.5, 5, 7.5, and 22.5 nM miR-92 for BiRDz, 2i-DTh, 3i-DTh, and 5i-DTh, respectively, confirming high efficiency of the system.

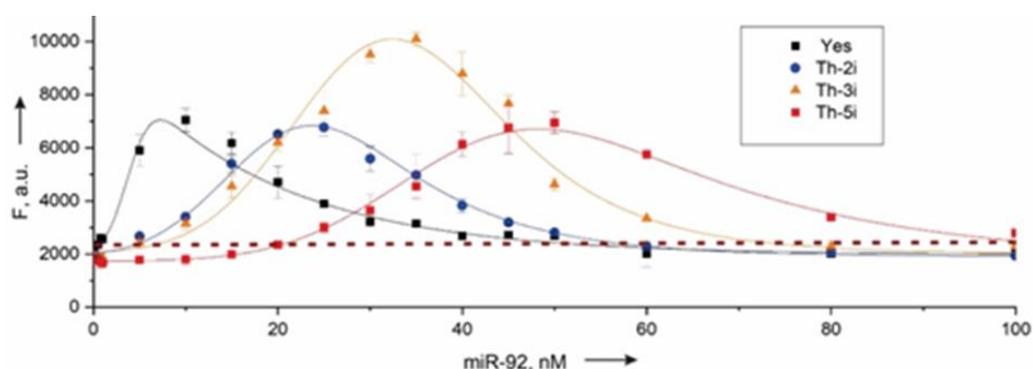


Figure 3. F-sub (200 μ M), DNA Constructs (10 nM each strand), and miR-92 concentrations (0.1 nM to 100 nM) were incubated at 37°C for 1 h. Data, averaged from three independent measurements, were curve-fitted using Convolution GauseMod in Origin.

The RNA-binding arms of BiRDz, 2i-DTh, 3i-DTh, 4i-DTh, and 5i-DTh were further optimized for cleavage of a 60-nucleotide GFP mRNA (RNA-60) in 2mM Mg^{2+} buffer, simulating physiological conditions. Constructs were pre-incubated with varying miR-92 concentrations and then exposed to RNA-60. Cleavage products were analyzed via denaturing PAGE (Figure 4). Cleavage was observed at lower miR-92 concentrations for 2i-DTh, 3i-DTh, and 4i-DTh, while 5i-DTh required 300nM miR-92, confirming effective RNA targeting and unwinding by these constructs under near-physiological conditions.

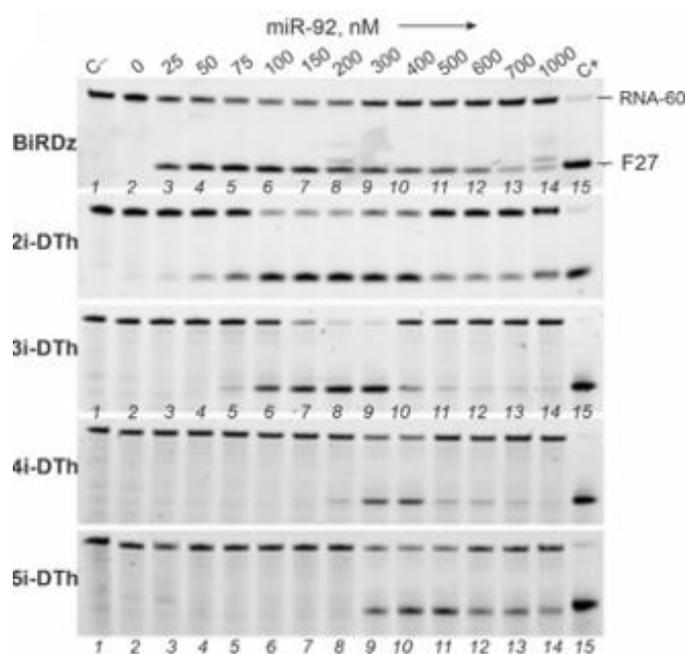


Figure 4. RNA-60 cleaved by DNA Constructs activated by miR-92 molecules. Cleavage analysis of different constructs at miR-92 concentrations (25 to 1000 nM) with 1000 nM RNA-60, incubated at 37°C for 24 h. Positive control (C+) contained full DNAzyme (RDz1-92), while negative control contained only RNA.

Cleavage efficiency and selectivity assessment of the thresholding DNA Constructs targeting F_{sub} and DAD-1 mRNA (RNA-46). The previous binary DTh constructs had a limitation where individual oligonucleotides (Dza and Dzb) partially hybridized to different analyte molecules in the presence of excess analyte, inhibiting the formation of the full enzymatic unit and reducing activity. The new design, reforming these constructs into DNA thresholding Constructs (Th-DNMs) with a tile-attached platform, aims to enhance cooperativity, prevent decomposition in high analyte concentrations, and boost reaction rates. The tile-attached platform keeps Dza and Dzb in proximity, ensuring higher local concentrations of active parts. Th-DNM-2i and Th-DNM-3i constructs, requiring two and three input molecules respectively, use the platform to facilitate substrate cleavage and fluorescent signal release. BiDz was also redesigned to incorporate the same linker tile for consistent comparison.

To demonstrate versatility, DNA Constructs' substrate-binding arms were adapted to cleave RNA-46, encoding the DAD1 sequence. Constructs DNM, Th-DNM-2i, and Th-DNM-3i were evaluated with miR-17 (0–1000 nM) and RNA-46 (1000 nM). In the

presence of 100 nM, maximum activation was observed at 100, 200, and 300 nM miR-17 for DNM, Th-DNM-2i, and Th-DNM-3i, with cleavage rates of 0.580 nM/min, 0.601 nM/min, and 0.578 nM/min, respectively (Figure 5). Threshold concentrations for activation were approximately 2 nM, 25 nM, and 55 nM for DNM, Th-DNM-2i, and Th-DNM-3i, respectively.

At reduced concentrations of DNA Constructs (3 nM) (Figure 6), maximum activation occurred at 3, 6, and 9 nM miR-17, showing cleavage rates of 0.012 nM/min, 0.014 nM/min, and 0.020 nM/min. Th-DNMs demonstrated stable performance with high analyte excess, indicating effective recognition and cleavage even at low concentrations.

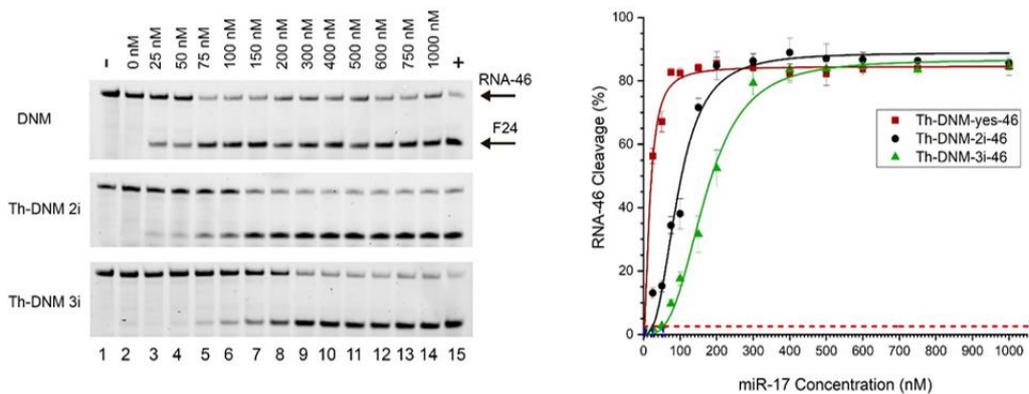


Figure 5. Schematic of tile-attached Th-DNM for RNA-46 cleavage. PAGE showing RNA-46 cleavage (1000 nM) by DNA Constructs (100 nM) at varying miR-17 concentrations after 24 h at 37°C, with maximum activation at 100, 200, and 300 nM, and threshold concentrations 2, 25, and 55 nM for DNM, Th-DNM-2i, and Th-DNM-3i, respectively. Graphic of Th-DNMs' activity.

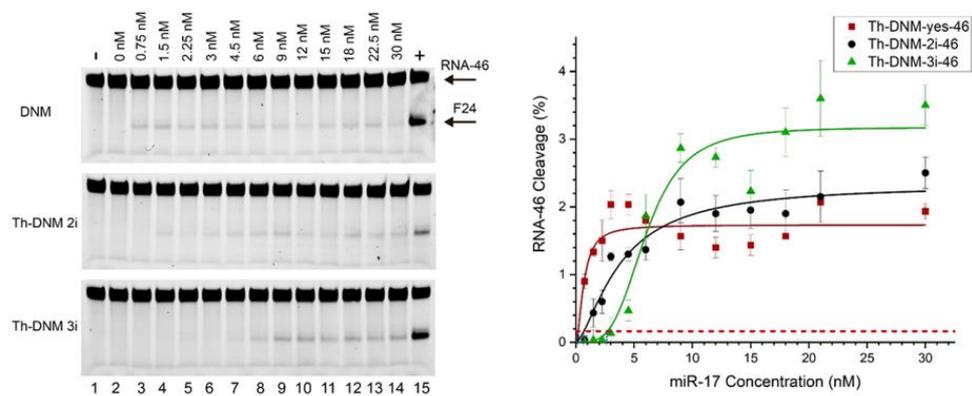


Figure 6. Gel electrophoresis showing RNA-46 (1000 nM) cleavage by DNA Constructs (3 nM) with varying miR-17 concentrations after 24 h at 37°C. Maximum activation at 3 nM, 6 nM, and 9 nM miR-17 for DNM, Th-DNM-2i, and Th-DNM-3i. Threshold concentrations were approximately 0.15 nM, 0.72 nM, and 2.7 nM, respectively.

Design and Cleavage efficiency assessment of DNA logic gates targeting F_{sub}.

Six DNA logic gates were designed using modified Dz_a and Dz_b strands: YES, 2iAND-A and B gates, 3iAND, 2iINHIBIT, and 3iINHIBIT. These gates utilized the binary Dz 10-23 (biDz) for its RNA-cleaving ability and high turnover frequency. Modules were attached to a common DNA tile to enhance cooperativity and ensure strict input-dependent regulation.

The length of F_{sub} binding arms was optimized to 9 and 7 nts for Dz_a and Dz_b, respectively, enhancing fluorescence at 37°C. The YES gate, 2iAND-A, 2iAND-B, 3iAND, 2iINHIBIT, and 3iINHIBIT gates were tested with 100 nM gates, 100 nM inputs, and 200 nM fluorogenic substrate in reaction buffer. Fluorescence was measured after 1 h at 37°C. The threshold for each gate was set at three standard deviations above the background. The YES gate showed a signal-to-background ratio of 4.58 ± 0.36 , indicating robust performance, though lower than traditional Dz 10-23 due to its design constraints. The 2iAND and 3iAND gates exhibited high true-to-false signal ratios, with values of 3.00 ± 0.34 , 2.3 ± 0.8 , and 1.73 ± 0.06 at various time intervals. All the DNA logic gates including The INHIBIT gates also aligned with theoretical predictions following the truth table. However the inhibit gates showed total inhibition after increasing the concentration of the inhibiting input by 2 and 3 times (Figure7).

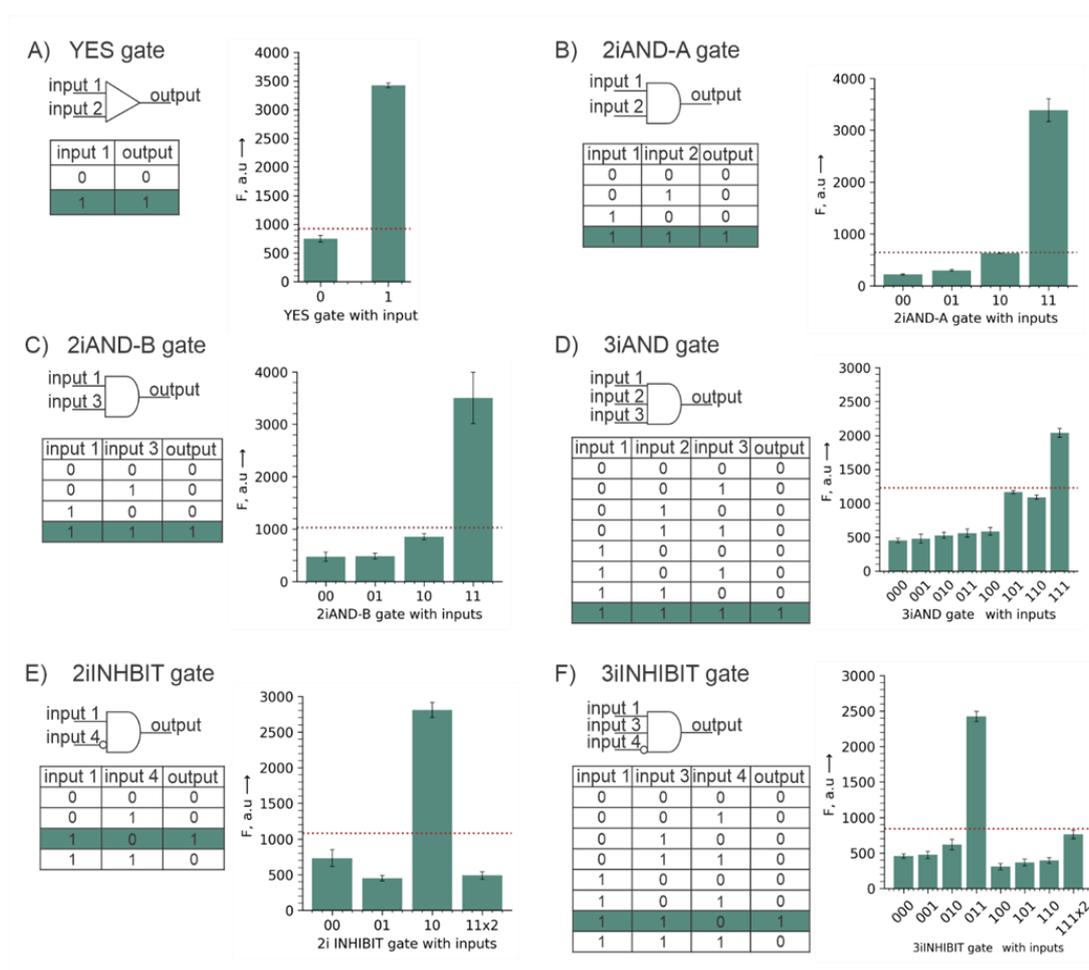


Figure 7. Logical operation, truth table, and F_{sub} cleavage results for six logic gates: 100 nM of each gate was mixed with 100 nM inputs and 200 nM F_{sub} , incubated at 37°C for 1 hour. Fluorescence indicates F_{sub} cleavage, with output 1 or 0, above or below the threshold set at three standard deviations above background. A) YES showed a signal-to-background ratio of 4.58 ± 0.36 . B-D) 2iAND-A, 2iAND-B, and 3iAND, in general, maintained high true-to-false signal ratios of 3.00 ± 0.34 (7-50 min), 2.3 ± 0.8 (5-15 min), and 1.73 ± 0.06 (4-16 min), respectively. E) 2iINHIBIT gate had a true-to-false ratio of 1.73 ± 0.06 (6-8 min), increasing to 3.22 ± 0.12 (6-60 min) with doubled 4th input. F) 3iINHIBIT gate had a true-to-false ratio of 1.72 ± 0.06 (up to 30 min), increasing to 3.00 ± 0.06 (up to 1 h) with doubled 4th input.

Cleavage efficiency assessment of ASO-based DNA thresholder agents.

BiASO, 2i-A Th, and 3i-A Th exhibited distinct activation profiles in response to miR-17 concentrations. BiASO showed hyperbolic activity with a plateau at concentrations above 50 nM, reaching maximum activation around 50 nM miR-17. In contrast, 2i-A Th and 3i-A Th demonstrated sigmoidal activation curves, with thresholds at 7.5 and 39.5 nM miR-17, respectively. Maximum activation for 2i-A Th and 3i-A Th was observed at 100 and 150 nM miR-17, respectively. These results indicate that the DNA thresholders

can effectively modulate RNA-cleaving activities across a broad range of miR-17 concentrations (Figure 8).

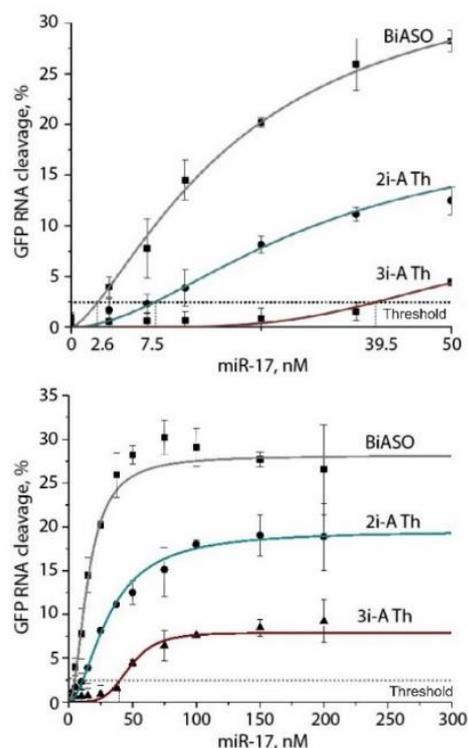


Figure 8. A) 3i-A Th in complex with 3 miR-17 and GFP RNA. Cleavage of GFP RNA (1000 nM) by BiASO, 2i-A Th, 3i-A Th (50 nM). Quantification of three cleavage experiments. GFP RNA cleavage efficacy (%) with varying miR-17 concentrations (0-500 nM).

Fluorescent assay and comparison of limit of detection between the 4DNM and the Bi-Dz targeting a synthetic DNA fragment of SARS-CoV-2. While Binary DNazymes (BiDzs) based on the core 10-23 show promise, they face challenges with long RNA analytes due to stable secondary structures. The 4-arm DNA machine (4DNM) enhances BiDzs by incorporating two additional sensing regions near the BiDz, which help unwind RNA secondary structures. These extra arms are connected to a scaffold tile, stabilizing the hybridization of the DNA construct to the RNA target and increasing sensitivity. After testing the construct and calculating a limit of detection (LOD) of 1 pM, both the construct and the simple BiDz were tested on viral RNA extracted from infected cells. The results showed detection only with the 4DNM (Figure 9). The 4DNM demonstrated high selectivity by detecting only RNA of CoV-2 and not showing a signal with OC43 viral RNA (Figure 9B). Testing on clinical samples revealed that the 4DNM successfully detected 5 out of 9 CoV-2 positive samples confirmed by PCR (Figure 10).

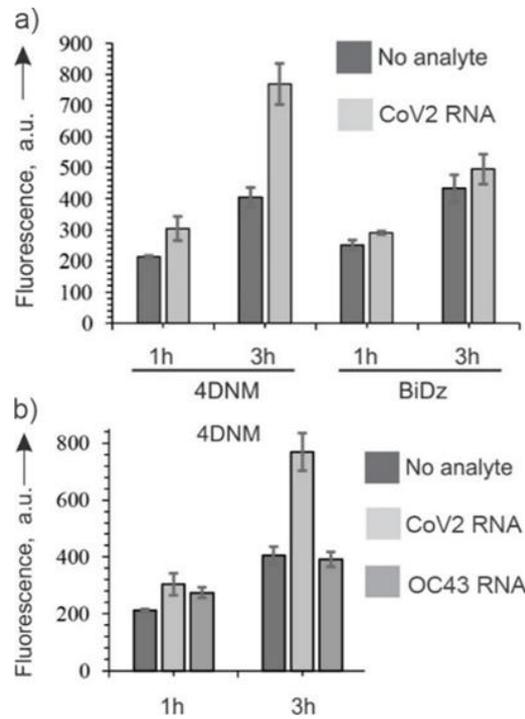


Figure 9. 4DNM selectively detects CoV2 RNA. A) Fluorescent response of 4DNM and BiDz with or without 125 pM CoV2 RNA. F-sub (200 nM) was incubated with BiDz (20 nM Dza, 5 nM Dzb) or DNM (20 nM Dza, 5 nM T1/T2 complex) and 3.8×10^9 CoV2 or OC43 RNA molecules in reaction buffer. Fluorescence at 517 nm ($\lambda_{ex} = 485$ nm) was recorded after 1 or 3 h at 55°C. Error bars represent one standard deviation from three independent experiments. B) Selectivity of 4DNM. Fluorescent response to 3.8×10^9 CoV2 or OC43 RNA molecules in 50 μ L (125 pM).

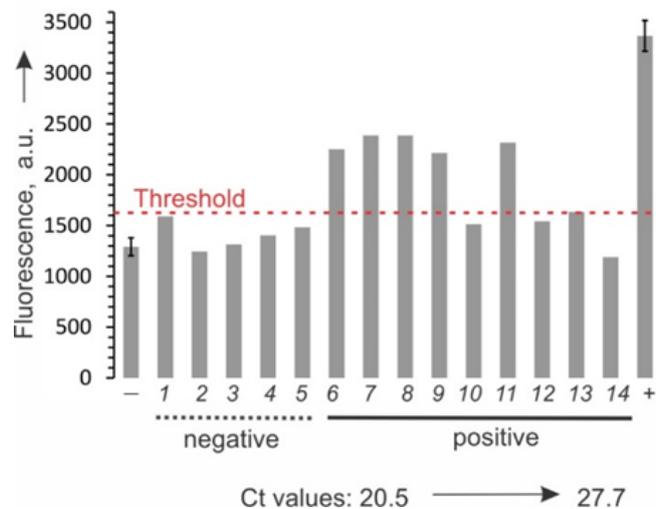


Figure 10. Analysis of clinical samples using 4DNM. All samples contained F-sub (200 nM) and 4DNM (20 nM Dza and 5 nM T1/T2 complex) in a reaction buffer, incubated at 55°C for 3 h. Positive control (last bar) had 20 pM synthetic CoV2-DNA1 analyte. Fluorescence at 517 nm ($\lambda_{ex} = 485$ nm) was measured. Nine CoV-2 positive and five negative samples from 14 individuals were confirmed by RT-qPCR with shown Ct values. Positive samples Ct values: 6-20.4; 7-21.0; 8-21.8; 9-22.0; 10-22.9; 11-24.2; 12-25.5; 13-25.9; 14-27.7. Samples 1-14 were measured once to ensure maximum viral RNA concentration, thus lacking standard deviation. Standard deviations for negative (-) and positive (+)

controls were from three independent measurements. Threshold line: 3 standard deviations above average (–) control.

Spectrophotometric analysis of the DNA construct (HDNM) equipped with a substrate delivery element ("hook") targeting COV2-DNA1 and detection of SARS-CoV-2 RNA among total RNA isolated from infected Vero cells. The hook-equipped DNA Constructs (HDNM) features a scaffold (T1, T2, T3) and two hooks that bind up to three F-sub molecules each. T1 and T2 are linked via HEG linkers, facilitating RNA unwinding and substrate delivery. HDNM operates optimally at 55°C, enhancing detection sensitivity about 180 times more than 4DNM with LOD 0.025 after 3h of incubation (table 1).

For more investigation of the scaffold's abilities The MDNM was designed, it integrates multiple cores, featuring a scaffold with T1, T2, T3, and T4 arms, and four additional oligonucleotides (A10, A20, A30, A40) to form multiple cores structures. This design enhances detection of one target and produce 4 signals from the same target. Incorporating additional binding arms is improving target unwinding, fluorescence signal generation, and overall sensitivity less about 4 times than 4DNM with LOD 0.3pM after 3 h (table 1).

Table 1. Comparison of the LOD for different DNA Constructs

Name of DNA Construct	LOD, 1 h	LOD, 3 h
BiDZ	-	10 pM
4DNM for DNA analyte	10 pM	1 pM
4DNM for RNA analyte	-	26 pM
HDNM for DNA analyte	0.063 pM	0.025 pM
HDNM for RNA analyte	26 pM	2 pM
MDNM for DNA analyte	2.6 pM	0.3M
MDNM for RNA analyte	28 pM	5 pM

At this stage, experiments using DNA constructs in living cells have not been conducted, and all the presented results pertain exclusively to *in vitro* experiments in a cell-free system. However, the demonstrated efficiency and functionality of the constructs in these conditions represent an important step toward their potential applicability in cellular systems. Further research in cell models is necessary to assess the biological activity and stability of the constructs in living cells. These studies are planned as the next phase of the work. Potential challenges, such as construct delivery into cells, resistance to cellular nucleases, and interactions with intracellular molecules, certainly require additional investigation.

CONCLUSIONS

This work demonstrated that complex multicomponent DNA Constructs can effectively recognize biologically significant RNA, laying the groundwork for applying DNA nanotechnology and molecular DNA nanorobots in disease detection and therapy.

1. 21 DNA constructs based on binary DNAzymes (biDz) and 3 DNA constructs based on antisense oligonucleotides (ASO) were developed. The DNA constructs BiRDz, 2i-DTh, 3i-DTh, 4i-DTh, and 5i-DTh activated RNA target cleavage at miR-92 concentrations of 0.25, 20, 80, 90, and 190 nM, respectively. DNA constructs containing a DNA scaffold, such as DNM, Th-DNM-2i-46, and Th-DNM-3i-46, were activated at 2, 25, and 55 nM miR-17, respectively. The DNA constructs BiASO, 2i-A Th, and 3i-A Th were activated at miR-17 concentrations of 2.6, 7.5, and 39.5 nM, respectively. The threshold concentration of oncogenic microRNAs for DNA construct activation depended on the number of microRNA-binding sites in the DNA constructs.

2. 12 DNA constructs based on biDz were developed, containing all functional oligonucleotides attached to a single scaffold and operating on the principle of logic gates. The DNA constructs YES, 2iAND-A, and 2iAND-B demonstrated RNA target cleavage with signal-to-background ratios of 80.4, 10.3, and 39.2, respectively, after 7 hours of incubation. The DNA constructs 3iAND, 2iINHIBIT, and 3iINHIBIT demonstrated RNA target cleavage with signal-to-background ratios of 18.3, 4.3, 3.9, and 26, respectively, after 24 hours of incubation. The DNA constructs 2iINHIBIT and 3iINHIBIT showed

complete inhibition of RNA target cleavage after the addition of the tumor suppressor miR-7 at a concentration 1 and 2 times higher than that of the DNA construct itself, respectively.

3. 3 DNA constructs were developed for the detection of DNA and RNA analytes of SARS-CoV-2. The 4DNM DNA construct, equipped with two additional RNA-binding sites, demonstrated a limit of detection (LOD) of 1 pM for the synthetic DNA analyte. The LOD for the RNA analyte was 26 pM after 3 hours of incubation, whereas biDz was unable to detect RNA. The HDNM DNA construct, with a substrate delivery function, showed an LOD of 0.063 pM and 0.025 pM after 1 and 3 hours, respectively. The LOD for the RNA analyte was 26 pM and 2 pM after 1 and 3 hours, respectively. The MDNM DNA construct, with four catalytic centers, demonstrated an LOD for the synthetic DNA analyte of 6.5, 2.6, and 0.3 pM after 0.5, 1, and 3 hours, respectively. The LOD for the RNA analyte was 28 pM and 5 pM after 1 and 3 hours, respectively, showing improved sensitivity, as 4DNM did not detect viral RNA after 1 hour of incubation.

Recommendations and Prospects for Further Development. The results of this dissertation research can be utilized in the development of diagnostic and therapeutic approaches for oncological and viral diseases, as well as in expanding the application of DNA probes in biomedicine. Further modifications of DNA constructs may be conducted to lower the sensitivity threshold and enhance the efficiency of RNA target cleavage. Additionally, investigating the effects of various chemical modifications on the stability and catalytic activity of the constructs remains an important direction. Another promising avenue is the study of the kinetics of interactions between logical DNA constructs and microRNAs to predict response times. Adapting these technologies to modern molecular diagnostic platforms, miniaturizing DNA constructs, and integrating them into portable devices for rapid analysis are also key areas for future development. Moreover, continued research on biocompatibility and the development of safe methods for introducing DNA constructs into the body for potential therapeutic applications are necessary.

LIST OF PUBLICATIONS ON THE TOPIC OF THE THESIS

Publications in editions indexed by the Scopus and Web of Science:

1. Nour M. RNase H-dependent DNA thresholder modulated by cancer marker concentration / Drozd V.S., Lemeshko E.A., Tafran L., Salimova A.A., Kulikova A.V., **Eldeeb A.A.** // Chemical Communications. – 2024. – Vol. 60, №. 33. – P. 4427–4430. doi: 10.1039/d4cc00495g
2. Smirnov V.V. Towards the Development of a DNA Automaton: Modular RNA-cleaving Deoxyribozyme Logic Gates Regulated by miRNAs / Drozd V.S., Patra C.K., Hussein Z., Rybalko D.S., Kozlova A.V., Nour M., Zemerova T.P., Kolosova O.S., Kalnin A.Y., **El-Deeb A.** // Analyst. – 2024. – Vol. 149, № 6. – P. 1947– 957. doi: 10.1039/d3an02178e
3. Patra C. Thresholding DNA nanomachine as a highly cooperative and efficient enzyme-like system for controlled RNA cleavage / **Eldeeb A.A.** // Chem. Med. Chem. – 2023. – Vol. 18, № 7. – P. e202300040. doi: 10.1002/cmdc.202300040
4. Nour M.A. Distinguishing High from Low Concentrations of RNA Cancer Marker: Five-Input DNzyme Thresholding Gate / Kulikova A.V., Wanjohi J., **El-Deeb A.** // Chemistry Select. – 2023. – Vol. 8, № 48. – P. e202303011. <https://doi.org/10.1002/slct.202303011>
5. Hussein Z. DNzyme Nanomachine with Fluorogenic Substrate Delivery Function: Advancing Sensitivity in Nucleic Acid Detection /Nour M., Kozlova A.V., Kolpashchikov D.M., Komissarov A., **El-Deeb A.** // Analytical Chemistry. – 2023. – Vol. 95, № 51. – P. 18667–18672. doi: 10.1021/acs.analchem.3c04420
6. **El-Deeb A.** Toward a Home Test for COVID-19 Diagnosis: DNA Machine for Amplification-Free SARS-CoV-2 Detection in Clinical Samples / Zablotskaya S., Rubel M.S., Nour M., Kozlovskaya L., Shtro A., Komissarov A., Kolpashchikov D.M. // Chem. Med. Chem. – 2022. – Vol. 17, № 20. – P. e202200382. doi: 10.1002/cmdc.202200382
7. Gomes de Oliveira A. RNA-Cleaving DNA Thresholder Controlled by Concentrations of miRNA Cancer Marker / Dubovichenko M.V., **Eldeeb A.A.**, Wanjohi J., Zablotskaya S., Kolpashchikov D.M. // Chem. Bio. Chem. – 2021. – Vol. 22, № 10. – P. 1750–1754. doi: 10.1002/cbic.202000769

Publications in other editions:

8. Хусейн З. Advancing DNA automation: miRNAs-regulated “NOT-gate” logic elements based on deoxyribozyme DNA machines / Смирнов В., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов X международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. – 2023. – P. 533–534.
9. Головина Л.А. Многоядерная ДНК-машина на основе бинарных дезоксирибозимов для безамплификационной детекции SARS-COV-2 / Хусейн З., Колпащиков Д.М., Комиссаров А.Б., **Эльдиб А.А.** // Сборник научных трудов 4-й международной конференции «Современные

достижения химикобиологических наук в профилактической и клинической медицине», посвященной 135-летию со дня рождения профессора В. В. Лебединского. – 2023. – № 56. – С. 24–30.

10. Головина Л.А. Multicore DNA-machine based on binary deoxyribozyme for amplification-free detection of SARS-COV-2 / Хусейн З., Комиссаров А.Б., Колпащиков Д.М., **Эльдиб А.А.** // Сборник тезисов X международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. – 2023. – С. 531–532.

11. Головина Л.А. ДНК-машины на основе бинарных дезоксирибозимов как перспективный инструмент безамплификационной диагностики SARS-CoV-2 / Хусейн З., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М., Комиссаров А.Б. // Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых. – 2023. – С. 30–31.

12. Головина Л.А. ДНК-машина с несколькими каталитическими центрами на основе дезоксирибозима для безамплификационного детектирования SARS-COV-2 / Хусейн З., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Материалы XXVI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. – 2023. – С. 34–35.

13. Хусейн З. Antenna-equipped deoxyribozyme machine for ultra-sensitivity amplification-free detection of SARS-COV-2 RNA / **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов IX международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. – 2022. – Р. 694–695.

14. Хусейн З. Antenna-equipped deoxyribozyme-based DNA machine for ultra-sensitivity detection of SARS-COV-2 RNA / **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Материалы всероссийской конференции: Синтетическая биология и биофармацевтика. – 2022. – Р. 147.

15. Смирнов В. Разработка логического вентиля «INHIBIT GATE» на основе бинарного дезоксирибозима / Дрозд В.С., Лаушкина В.О., Васильева Т.В., Кальнин А.Ю., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов 25-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». – 2022. – С. 144.

16. Головина Л.А. ДНК машина с несколькими каталитическими центрами на основе дезоксирибозима для безамплификационной детекции SARS-COV-2 / Хусейн З., **Эльдиб А.А.** // Неделя науки 2022: материалы Международного молодёжного форума. – 2022. – С. 760–761.

17. Мустафа А. Distinguishing high from low concentrations of RNA cancer marker: 5-input binary deoxyribozyme thresholding gate / Ванджои Д., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов: Конференция Новосибирского национального исследовательского государственного университета. – 2021. – С. 253–254.

18. Smirnov V. Development of protections for antisense and binary antisense agents / Nedorezova D.D., Drozd V.S., **Eldeeb A.A.**, Kolpashchikov D.M. // Сборник тезисов VIII международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. – 2021. – С. 143.

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA – deoxyribonucleic acid

RNA – ribonucleic acid

mRNA – messenger RNA

miR – microRNA

LOD - (Levels of Detail) – detection limit

PCR – polymerase chain reaction

SARS-CoV-2 - (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2) — (+) RNA virus

BHQ-1 – (Black Hole Quencher) - a fluorescent quencher to the 3' end of an oligonucleotide

Vero cells - are mammalian cell line

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

EDTA — Ethylenediaminetetraacetic Acid

DMSO — Dimethyl sulfoxide

Эльдиб Ахмед Абделкадер Мохамед Отман

РАСПОЗНАВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ДНК НАНОКОНСТРУКЦИЙ

В данном исследовании ДНК-конструкции на основе biDz были разработаны для (i) различения низких и высоких концентраций последовательностей РНК раковых маркеров; (ii) распознавания нескольких последовательностей биомаркеров; и (iii) обнаружения низких концентраций вирусного РНК анализата без его предварительной амплификации. Расщепление целевой РНК *in vitro* было достигнуто с помощью ДНК-конструкций на основе ViDz и антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) в присутствии разных концентраций miR-17 и miR-92. Были разработаны ДНК-конструкции с булевыми логическими функциями YES, 2AND, 3AND, 2 iINHIBIT и 3 iINHIBIT, содержащие все функциональные компоненты каждого отдельного логического вентиля, присоединенные к универсальному ДНК-скаффолду. Расщепление целевой РНК достигалось

различными комбинациями miR15, miR17, miR 21, miR 7 в соответствии с таблицами истинности. ДНК-конструкции на основе biDz, оснащенные двумя дополнительными сайтами для разворачивания РНК, и ДНК-конструкции со множеством РНК-расщепляющих каталитических центров показали более низкий предел обнаружения (LOD) по сравнению с обычным сенсором biDz. Функция доставки флуорогенного субстрата также улучшила LOD ДНК-конструкций для обнаружения синтетических ДНК и РНК аналитов. Таким образом, сложные многокомпонентные ДНК-конструкции могут эффективно распознавать РНК, закладывая основу для применения ДНК-нанотехнологий и молекулярных ДНК-нанороботов для обнаружения и лечения заболеваний.

El-Deeb Ahmed Abdelkader Mohamed Othman

RECOGNITION OF NUCLEIC ACIDS USING MULTICOMPONENT DNA NANOCONSTRUCTS

In this study, DNA Constructs based on biDz was adopted for (i) differentiation low from high concentrations of cancer marker RNA sequences; (ii) recognition of multiple biomarker sequences; (iii) detecting low concentrations of viral RNA in amplification free format. *In vitro* RNA cleavage was achieved by biDz-based DNA Constructs and antisense oligonucleotide (ASO)-based DNA Constructs in the presence of different concentrations of miR-17 and miR-92. DNA Constructs with YES, 2AND, 3AND, 2 iINHIBIT and, 3 iINHIBIT Boolean logic functions were developed containing all the functional components of each individual gate attached to an individual DNA scaffold. RNA cleavage was achieved by a different combination of miR15, miR17, miR 21, miR 7 according to the truth tables. BiDz-based DNA Constructs equipped with 2 additional RNA-unwinding arms and multicore biDz-based DNA Construct showed decreased LOD than that demonstrated by conventional biDz sensor. The fluorogenic substrate delivery function as well improved LOD of biDz-based DNA Constructs for synthetic DNA and RNA analyte detection. Thus, complex multicomponent DNA Constructs can effectively RNA, laying the groundwork for applying DNA nanotechnology and molecular DNA nanorobots in disease detection and therapy.

Эльдиб Ахмед Абделкадер Мохамед Отман

**РАСПОЗНАВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ДНК НАНОКОНСТРУКЦИЙ**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

Научный руководитель:

Колпашиков Дмитрий Михайлович
кандидат химических наук, профессор,
руководитель лаборатории ДНК-наномашин для
биомедицинского применения Университета
Центральной Флориды, США

Официальные оппоненты:

Грядунов Дмитрий Александрович
доктор биологических наук, главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией технологий молекулярной
диагностики ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской АН (ИМБ РАН)

Бончук Артём Николаевич
доктор биологических наук, старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии
наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Институт химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского Отделения
Российской академии наук», Министерства
здравоохранения РФ (ИХБФМ СО РАН)

Защита состоится 30 апреля 2025 г. на заседании диссертационного совета ПДС 0300.025 при
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г.
Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ
ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» 117198, г. Москва, ул.
Миклухо-Маклая, д. 6.

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу:
<https://www.rudn.ru/science/dissovet> и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК
при Минобрнауки России: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.025
доктор биологических наук, профессор

Лукашева Елена Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Гибридизация нуклеиновых кислот с РНК используется в диагностике и терапии. Этот подход опирается на свойства нуклеиновых кислот, позволяющие им распознавать и связываться с определёнными последовательностями, что открывает возможности для разработки таргентных терапевтических агентов и высокочувствительных диагностических тестов (Kolpashchikov, 2019). В данной работе применяются подходы ДНК-нанотехнологий для создания нового поколения многокомпонентных гибридизационных зондов для применения в двух ключевых областях: лечении и диагностике заболеваний человека.

Гибридизационные зонды на основе ДНК обладают высокой специфичностью и могут быть разработаны для распознавания маркеров генетических заболеваний, что делает их незаменимыми в анализе и лечении заболеваний человека (Gerasimova, Kolpashchikov, 2010). Ранее было показано, что использование нескольких гибридизационных зондов (элементов) может улучшить селективность, чувствительность и возможность мультиплексирования гибридизационных подходов (Gerasimova et al., 2010). Эти функциональные элементы могут быть объединены в одну наноструктуру, называемую ДНК-конструкция, с улучшенной кооперативностью в распознавании ДНК и РНК (Nedorezova et al., 2019). Было выдвинуто предположение, что гибридизационные зонды и ДНК-конструкции способны эволюционировать в ДНК-нанороботов, обладающих следующими четырьмя функциями: (i) распознавание маркеров заболеваний, (ii) вычисление при анализе нескольких маркеров, (iii) активация для выполнения терапевтического лечения и (iv) автоматическая доставка в клетки (Wang et al., 2022). В этом исследовании основное внимание уделено совершенствованию функций распознавания и вычисления ДНК-нанороботов.

В основе разработанных ДНК-конструкций лежит гибридизационный сенсор, названный бинарный ДНКзим или biDz. Он способен связываться с определенными нуклеотидными последовательностями (аналитами), после чего активируется

функция расщепления целевой РНК, что может также производить флуоресцентный сигнал для обнаружения аналитов. В данной работе сенсор biDz был преобразован в ДНК-конструкции, оснащенные множеством сайтов распознавания для связывания нескольких различных нуклеиновых кислот, что создает основу для анализа сложных смесей биологических маркеров. В данной работе подход ДНК-конструкций был адаптирован для (i) дифференциации низких и высоких концентраций онкомаркерных микроРНК; (ii) распознавания сразу нескольких последовательностей биомаркеров; (iii) обнаружения низких концентраций вирусной РНК без необходимости амплификации аналита.

Степень разработанности темы исследования. Исследования в области разработки ДНК-нанороботов с интегрированными модулями для распознавания и вычислений, направленными на диагностику и терапию заболеваний, находятся в активной стадии развития. В последние годы значительное внимание уделяется созданию ДНК-конструкций, способных выполнять сложные логические операции на молекулярном уровне, что открывает новые горизонты для применения ДНК-нанотехнологий в биомедицине. Исследования в области ДНК-нанотехнологий также сосредоточены на разработке олигонуклеотидов, которые при связывании целевой РНК запускают ее расщепление, таких как антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) в присутствии РНКазы H (Bartolucci et al., 2022) или РНК-расщепляющие ДНКзимы (Charut et al., 2023). Однако, методы, которые не имеют контроля активации путем предварительного анализа маркеров, а также свободного выбора целевой РНК, поскольку они в основном нацелены на онкогены и не убивают раковые клетки напрямую, по-прежнему сталкиваются с проблемой активации терапии в нормальных клетках, что может привести к значительным побочным эффектам.

ДНК-логические вентили, предложенные Khanum и соавторами (2020), включая YES, 2I AND и 3I AND на основе ДНКзима, не обладают возможностью соединения логических элементов в единой наноструктуре, что остается препятствием для разработки ДНК-процессора для анализа сложных наборов биологических маркеров. Кроме того, существует необходимость в создании ДНК-

логических вентилях, которые будут активироваться или ингибироваться в зависимости от наличия в клетке тех или иных маркеров.

Несмотря на значительный прогресс в этой области, остаются нерешенные вопросы, касающиеся интеграции различных модулей в единую систему, чувствительности распознавания маркеров и минимизации побочных эффектов, связанных с их использованием в организме. Также активно продолжают исследования по разработке новых механизмов регулирования и активации ДНК-нанороботов, включая использование антисмысловой технологии, ДНКзимов и новых типов логических вентилях.

Цель и задачи:

Цель диссертационной работы заключается в разработке многокомпонентных ДНК-конструкций и исследовании предела их чувствительности для детекции биологических маркеров с целью применения в диагностике заболеваний человека, а также в оценке способности конструкций вызывать биомаркер-зависимое расщепление РНК-мишени в контексте терапевтического использования.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать ДНК-конструкции на основе biDz и на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) для достижения *in vitro* расщепления РНК-мишени в присутствии низких и высоких концентраций онкомаркерных микроРНК.

2. Разработать ДНК-конструкции на основе biDz, работающих по принципу логических вентилях, и имеющих универсальный ДНК-скафолд, объединяющий все функциональные компоненты ДНК-конструкций в единый комплекс, для достижения ингибирования или активации расщепления субстрата в присутствии различных комбинаций онкомаркерных или онкосупрессивных микроРНК.

3. Разработать ДНК-конструкции на основе biDz для достижения снижения предела обнаружения (LOD) аналита за счет добавления в состав ДНК конструкций: а) дополнительных аналит-связывающих участков; б) функции доставки флуорогенного субстрата; в) дополнительных каталитических центров.

Научная новизна. Впервые было показано, что пороговая концентрация микроРНК маркеров, запускающая активацию ДНК-конструкции, может быть

настроена путем изменения количества участков распознавания микроРНК в ДНК-конструкции. Впервые ДНК-конструкции с функциями булевой логики 2AND, 3AND, 2iINHIBIT и 3iINHIBIT были объединены на универсальном ДНК-скафолде. Эти ДНК-конструкции позволили осуществить расщепление РНК при различных комбинациях маркерных микроРНК согласно таблицам истинности с определенными отношениями сигнала к фону. Впервые было продемонстрировано, что добавление каждого из трех элементов: (1) дополнительных РНК-связывающих участков, (2) функции доставки субстрата и (3) дополнительных каталитических центров в конструкции на основе бинарного дезоксирибозима biDz, значительно снижает предел обнаружения целевой РНК, среди суммарной РНК выделенной из инфицированных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы вносят существенный вклад в развитие ДНК-нанотехнологий для применения в диагностике и лечении заболеваний человека. Разработанные ДНК-конструкции могут быть так подстроены для определения нуклеиновых кислот и обладать высокой специфичностью как к их последовательностям, так и концентрациям, что создает основу для разработки автономных (действующих без участия оператора) конструкций, способных отличать нормальные клетки от раковых. Обнаружение низкой концентрации РНК-аналитов без использования методов амплификации нуклеиновых кислот может быть использовано в диагностике инфекционных заболеваний человека во время оказания медицинской помощи.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являются многокомпонентные гибридизационные зонды - ДНК-конструкции. Предметом исследования является чувствительность ДНК-конструкций при обнаружении РНК-аналитов и их активность по разрезанию целевой РНК в присутствии разных концентраций или специфических комбинаций онкологических маркеров.

Методология и методы исследования. Выбранные мишени РНК включали синтетические фрагменты мРНК гена GFP (RNA-60) и DAD-1 (RNA-46) для удобного мониторинга подавления этих генов в экспериментах с клеточными культурами в перспективе, а также в качестве аналита была выбрана вирусная РНК

SARS-CoV-2, учитывая значительную глобальную угрозу здоровью, вызванную высокой скоростью мутаций у РНК-вирусов. Определенные микроРНК, такие как miR-15-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-7d-let, miR-92a-1 (miR-15, miR-17, miR-21, miR-7, miR-92, соответственно), были выбраны в качестве онкологических маркеров из-за их повышенного уровня экспрессии при различных видах рака, что делает их актуальной и сложной мишенью для распознавания с помощью ДНК-конструкций. Основные методы исследования включали полиакриламидный гель-электрофорез (ПААГ), количественный анализ расщепления РНК на основе спектрофотометрии и статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. *In vitro* расщепление целевой РНК может быть достигнуто при высоких, но не низких концентрациях онкологических маркеров за счет добавления большего числа сайтов связывания маркеров в структуру ДНК-конструкций на основе biDz.

2. *In vitro* расщепление целевой РНК может быть достигнуто при высоких, но не низких концентрациях онкологических маркеров за счет добавления большего числа сайтов связывания маркеров в структуру ДНК-конструкции на основе АСО.

3. ДНК-конструкции на основе логических вентилях, содержащие все функциональные элементы в составе единой наноструктуры, могут расщеплять целевую РНК только в присутствии заданного набора микроРНК, что соответствует поведению логических операций AND и INHIBIT булевой логики.

4. Добавление РНК-связывающих участков к ДНК-конструкции на основе biDz снижает LOD для детекции вирусных ДНК и РНК-аналитов, свернутых в стабильные вторичные структуры.

5. Добавление функции доставки флуорогенного субстрата к ДНК-конструкциям на основе biDz снижает LOD для детекции вирусных ДНК и РНК-аналитов.

6. ДНК-конструкции на основе biDz, оснащенные несколькими каталитическими центрами для расщепления РНК, демонстрирует более низкий LOD для детекции вирусных ДНК и РНК-аналитов по сравнению с biDz сенсором, имеющим только один каталитический центр.

Степень достоверности научных достижений. Для обеспечения и подтверждения высокой степени надежности в работе использован комплекс современных экспериментальных методов исследования и статистики. Научные положения, выводы и рекомендации основаны на анализе большого количества научной литературы и подтверждены экспериментальными данными.

Апробация исследования. Результаты работы представлены в 18 публикациях (статьи, тезисы) - 7 статей включены в базы цитирования Scopus и Web of Science, 11 тезисов представлены на 9 всероссийских и международных конференциях.

Работа выполнена при поддержке фонда стратегии развития "Приоритет 2030" Университета ИТМО (№ 922017) и ПИШ ИТМО (№ 92145).

Соответствие темы требованиям паспорта специальности ВАК. Работа была выполнена в рамках паспорта специальности 1.5.4. Биохимия: п. 10 «Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии» и п.11 "Исследование проблем распознавания на молекулярном уровне, хранения и передачи информации в биологических системах".

Структура и объем диссертации. Текст диссертации изложен на 154 печатных страницах, иллюстрирован 72 рисунками и 10 таблицами. Список литературы содержит 168 источников. Диссертация оформлена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утвержденными в ГОСТ Р 7.0.11-2011.

Личный вклад автора. Автор был единолично или непосредственно вовлечен в получение всех представленных в работе результатов. Автор лично анализировал и интерпретировал данные с использованием статистических методов, описывал результаты и обсуждал выводы и заключения с научным руководителем и соавторами при подготовке публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 2. Методы и материалы

Экспериментальные процедуры. *Предсказание вторичной структуры.* Вторичная структура фрагментов РНК и их термодинамические параметры определялись с помощью приложения RNA Folding Form сервера MFold. Температуры плавления между РНК-связывающими участками и РНК-мишенями рассчитывались с помощью приложения Hybridization of two Different Strands of DNA or RNA сервера DNAMelt MFold. Энергетические параметры были выбраны в соответствии с условиями эксперимента: гибридизация ДНК/ДНК при 37°C, $[Na^+] = 165$ мМ, $[Mg^{2+}] = 2$ мМ и концентрации олигонуклеотидов: РНК = 1 мкМ, ДНК_{зим}/АСО = 0,003 - 0,1 мкМ.

Измерение концентрации олигонуклеотидов. Синтезированные олигонуклеотиды (ДНК-Синтез и Евроген, Россия) разводили водой, свободной от нуклеаз, до концентрации ~ 100 мкМ. Из исходного раствора готовили несколько разведений и измеряли фактическую концентрацию с помощью наноспектрофотометра при длине волны 260 нм (коэффициент экстинкции был рассчитан прибором автоматически при вводе последовательности).

Сборка ДНК-конструкций. Эквимолярные концентрации различных олигонуклеотидов в составе ДНК-конструкций смешивали в реакционном буфере (50 мМ HEPES, 150 мМ KCl, 15 мМ NaCl и 2 мМ MgCl₂), переносили в стакан объемом 500 мл, заполненный предварительно нагретой до кипячения водой, и оставляли на ночь для постепенного охлаждения до комнатной температуры. Сборку ДНК-конструкций проверяли электрофорезом (нативный ПААГ или агарозный гель) и окрашивали (Gel red, SYBR Gold или бромистый этидий) для визуализации.

Спектрофотометрический анализ. Синтетический субстрат F_{sub}, меченый флуорофором (FAM) и гасителем (BHQ-1), был использован в качестве репортера сигнала при обнаружении аналитов. F_{sub}, ДНК-конструкции и аналиты (РНК или ДНК) инкубировали в реакционном буфере с соответствующим количеством ионов

магния (10-200 мМ) при 37°C и 55°C. Полученную флуоресценцию измеряли с помощью спектрофотометра TECAN при длине волны 480-525 нм.

Анализ расщепления РНК-мишени. РНК-мишень, ДНК-конструкции и онкологические маркеры инкубировали в реакционном буфере с соответствующим количеством ионов магния (2 мМ) при 37°C в течение 7-24 ч. Образец денатурировали при 95°C в течение 5 мин, охлаждали на льду в течение 5 мин и загружали в денатурирующий ПААГ. Гели визуализировали с помощью системы ChemiDoc Touch Imaging System и анализировали расщепление.

Анализ расщепления РНК с помощью РНКазы Н. РНК-мишень, меченая флуоресцентной меткой (FAM), ДНК-конструкции, различные концентрации маркерных микроРНК и рекомбинантная РНКазы Н инкубировались в реакционном буфере при 37°C в течение 20 мин. Образец денатурировали при 95°C в течение 5 мин, охлаждали на льду в течение 5 мин и загружали в денатурирующий ПААГ. Гели визуализировали с помощью системы ChemiDoc Touch Imaging System и анализировали процент расщепления в программе ImageLab.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Молекулярное компьютерное моделирование. Были разработаны три ДНК-конструкции с пороговой функцией (YES, 2i, 3i), которые активируются в ответ на определенные пороговые концентрации онкологического маркера miR-17 (входной сигнал или инпут). ДНК-конструкция YES требует одну молекулу miR-17 для активации ДНК-конструкции, 2i – требует две, а 3i - три. Активация приводит к формированию каталитического центра, который расщепляет субстрат F_{sub}, вызывая появление флуоресцентного сигнала. Пик активности наблюдался при концентрациях miR-17 равных 10 нМ, 20 нМ и 30 нМ для конструкций YES, 2i и 3i, соответственно (Рис. 1), с частотой оборотов 8,1 ч⁻¹, 9,8 ч⁻¹ и 9,7 ч⁻¹. Тесты на селективность подтвердили, что miR-20 (с 2 нуклеотидными несовпадениями) не вызывает активации, что демонстрирует специфичность ДНК-конструкций к miR-17.

Далее, РНК-связывающие участки YES, 2i и 3i были нацелены на РНК-46 гена DAD-1. Пик активности расщепления достигался, когда концентрация miR-17 была равна или превышала концентрацию ДНК-конструкции: 100 нМ для YES, 200 нМ для 2i, 300 нМ для 3i (Рис. 2). Однако, чрезмерный уровень концентрации входного сигнала снижал активность расщепления РНК-мишени, что подчеркивает необходимость в объединении индивидуальных олигонуклеотидов ДНК-конструкции в одну наноструктуру для решения проблемы падения активности при высоких концентрациях входного сигнала.

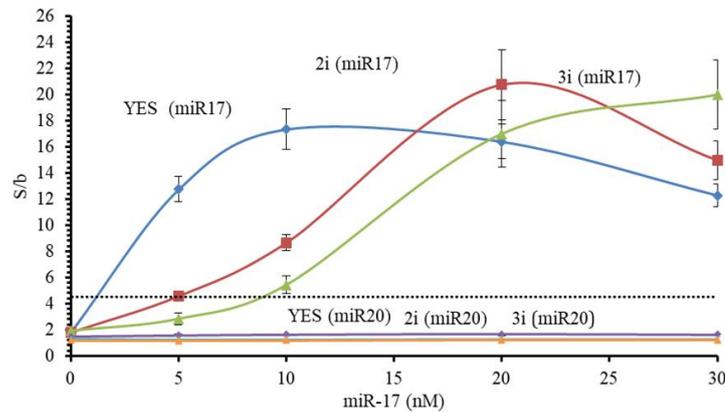


Рис. 1. Тестирование селективности ДНК-конструкций на основе biDz в присутствии селективного маркера miR-17 или неселективного miR-20 с несовпадением двух нуклеотидов. S/B – отношение сигнала к фону.

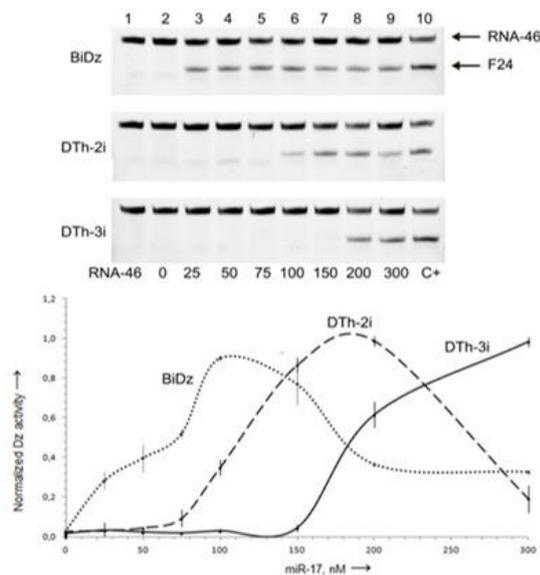


Рис. 2. Результаты расщепления мишени РНК-46 (1 мкМ), которую инкубировали с 100 нМ YES, 2i, 3i с различными концентрациями miR-17 в течение 24 ч при 37°C. Пики расщепления РНК-мишени для YES (biDz), 2i (или DTh-2i) и 3i (или DTh-3i) пришлись на 100 нМ, 200 нМ и 300 нМ концентрации miR-17, с частотой оборотов 1,17 ч⁻¹, 1,28 ч⁻¹ и 1,07 ч⁻¹, соответственно.

Оценка эффективности расщепления F_{sub} и GFP РНК-60 с помощью 5i ДНК-конструкции с пороговой функцией. Были разработаны ДНК-конструкции с пороговой функцией (2i-DTh, 3i-DTh, 5i-DTh) для активации расщепления F_{sub} в присутствии miR-92. Для активации 2i-DTh, 3i-DTh и 5i-DTh требуется две, три и пять молекул miR-92, соответственно, чтобы раскрутить ингибирующие петли и затем объединить каталитический центр, переведя его в активное состояние, для разрезания субстрата и генерации флуоресцентного сигнала.

Флуоресценция измерялась после инкубации с различными концентрациями miR-92. Yes, 2i-DTh, 3i-DTh и 5i-DTh продемонстрировали гиперболические флуоресцентные ответы, с пиковыми значениями активации при 10 нМ, 25 нМ и 35 нМ miR-92, соответственно. Для активации 5i-DTh требовалось пять молекул miR-92 (Рисунок 3). Порог активации составлял 1.5 нМ, 5 нМ, 7.5 нМ и 22.5 нМ miR-92 для Yes, 2i-DTh, 3i-DTh и 5i-DTh соответственно, что подтвердило пороговую функцию ДНК-конструкций.

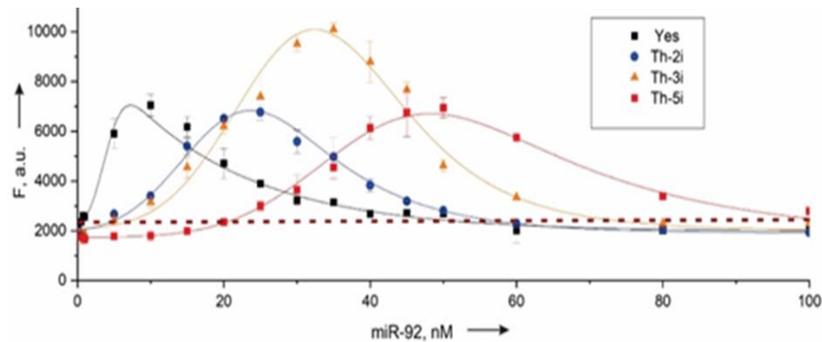


Рис. 3. Результаты спектрофотометрии. F-sub (200 мкМ), ДНК-конструкции (10 нМ) и различные концентрации miR-92 (от 0,1 нМ до 100 нМ) инкубировали при 37°C в течение 1 ч.

ДНК-конструкции с пороговой функцией BiRDz (Yes), 2i-DTh, 3i-DTh, 4i-DTh и 5i-DTh были протестированы для расщепления РНК GFP (RNA-60) в буфере с 2 мМ Mg²⁺, имитирующем физиологические условия. Продукты расщепления целевой РНК визуализировали с помощью денатурирующего ПААГ (Рис. 4). Расщепление наблюдалось при более низких концентрациях miR-92 для 2i-DTh, 3i-DTh и 4i-DTh, тогда как для активации 5i-DTh требовалось 300 нМ miR-92, что

подтвердило эффективное нацеливание РНК и пороговую функцию этих конструкций в условиях, близких к физиологическим.

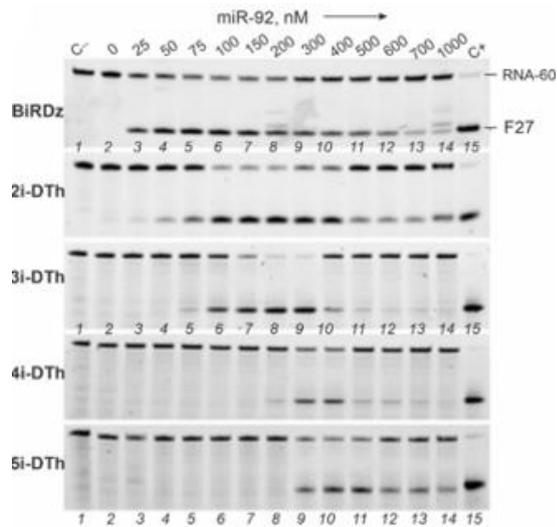


Рис. 4. Результаты расщепления РНК-60 (1 мкМ) ДНК-конструкциями (100 нМ) при концентрациях miR-92 (от 25 до 1000 нМ) при 37°C в течение 24 ч. Результаты расщепления РНК в денатурирующем ПААГ, где RNA-60 – не расщепленный субстрат, F27 – продукт расщепления.

Оценка эффективности расщепления F-sub и фрагмента мРНК DAD-1 (РНК-46) и селективности ДНК-конструкций с пороговой функцией. Предыдущие бинарные конструкции DTh имели ограничение, при котором отдельные олигонуклеотиды в составе конструкций (Dza и Dzb) частично гибридизовались с большим количеством молекул маркера в условиях его избытка, что препятствовало образованию активного каталитического центра и, следовательно, снижало активность расщепления субстрата. Было решено преобразовать эти конструкции в комплексные ДНК-ассоциации (Th-DNMs) путем объединения свободных олигонуклеотидов единым ДНК-скафолдом, чтобы улучшить кооперативность и предотвратить распад каталитического центра при высоких концентрациях маркера, а также увеличить скорость реакции. ДНК-скафолд удерживает Dza и Dzb в непосредственной близости друг от друга, обеспечивая более высокие локальные концентрации олигонуклеотидов в составе конструкции. Конструкции Th-DNM-2i и Th-DNM-3i, требующие соответственно двух и трёх входных молекул, используют ДНК-скафолд для облегчения разрезания субстрата и высвобождения флуоресцентного сигнала.

Для демонстрации универсальности ДНК-конструкции были адаптированы для разрезания РНК-46, кодирующей последовательность DAD1. Конструкции DNM-46, Th-DNM-2i-46 и Th-DNM-3i-46 были протестированы с miR-17 (0–1000 нМ) и РНК-46 (1000 нМ). В присутствии 100 нМ ДНК-конструкции максимальная активация расщепления РНК наблюдалась при концентрациях 100, 200 и 300 нМ miR-17 для DNM-46, Th-DNM-2i-46 и Th-DNM-3i-46, соответственно, со скоростью расщепления РНК 0,580 нМ/мин, 0,601 нМ/мин и 0,578 нМ/мин (Рис. 5). Пороговые концентрации для активации составляли приблизительно 2 нМ, 25 нМ и 55 нМ для DNM-46, Th-DNM-2i-46 и Th-DNM-3i-46, соответственно.

При сниженных концентрациях ДНК-конструкций (3 нМ) (Рис. 6) максимальная активация происходила при 3, 6 и 9 нМ miR-17 для тех же конструкций, со скоростью расщепления РНК 0,012 нМ/мин, 0,014 нМ/мин и 0,020 нМ/мин. Th-DNMs продемонстрировали стабильную работу при избытке маркера, показывая эффективное распознавание и расщепление РНК даже при низких концентрациях ДНК-конструкции.

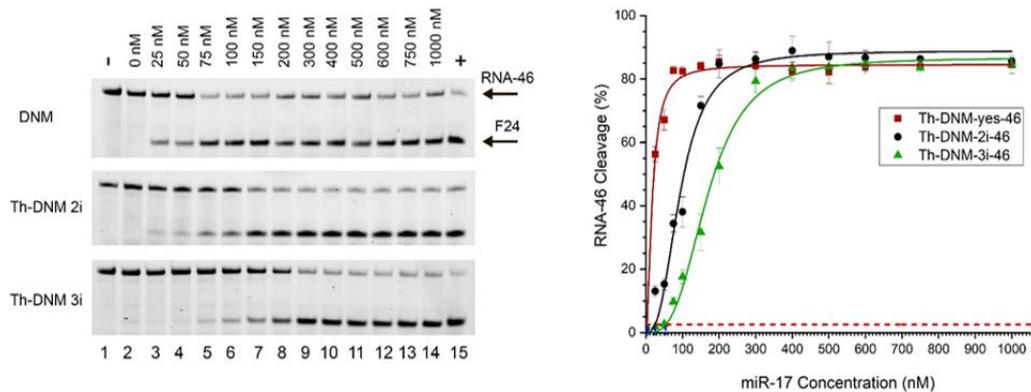


Рис. 5. Th-DNM-3i-46 с ДНК-скафолдом (Т3). Результаты электрофореза в денатурирующем ПААГ. РНК-46 (1000 нМ), ДНК-конструкции (100 нМ) при различных концентрациях miR-17 инкубировали 24 ч при 37°C. RNA-46 – нерасщепленный субстрат, F24 – продукт расщепления. График расщепления РНК-46 с помощью ДНК-конструкций в присутствии различных концентраций miR-17.

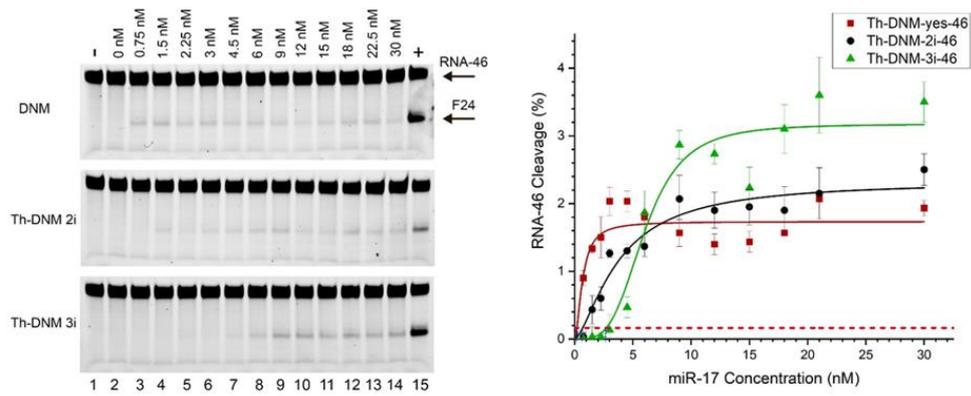


Рис. 6. Результаты расщепления РНК-46 (1000 нМ) с помощью ДНК-конструкций с пороговой функцией (3 нМ) с различной концентрацией miR-17 после инкубации в течение 24 ч при 37°C. Результаты электрофореза в денатурирующем ПААГ, где RNA-46 – нерасщепленный субстрат, F24- продукт расщепления. График расщепления РНК-46.

Оценка эффективности расщепления F-sub с помощью ДНК-конструкций на основе логических вентилей. Были разработаны шесть ДНК-конструкций на основе логических вентилей: YES, 2iAND-A, 2iAND-B, 3iAND, 2iINHIBIT, 3iINHIBIT. Свободные олигонуклеотиды в составе ДНК-конструкций были прикреплены к общему ДНК-скафолду для повышения кооперативности и обеспечения строгого регулирования в зависимости от входных сигналов.

Длина F_sub-связывающих участков была оптимизирована до 9 и 7 нуклеотидов для Dz_a и Dz_b, соответственно, что улучшило флуоресцентный выходной сигнал при 37°C. Логические ворота YES, 2iAND-A, 2iAND-B, 3iAND, 2iINHIBIT и 3iINHIBIT (100 нМ) были протестированы с концентрацией входных молекул 100 нМ и флуорогенного субстрата 200 нМ в реакционном буфере. Флуоресценция измерялась спустя 1 ч при 37°C. YES показали отношение сигнала к фону $4,58 \pm 0,36$, что указывает на соответствие активности этой ДНК-конструкции запрограммированному алгоритму в соответствии с таблицей истинности. 2iAND-A и B, а также 3iAND продемонстрировали отношения истинного сигнала к ложному, с показателями $3,00 \pm 0,34$, $2,3 \pm 0,8$ и $1,73 \pm 0,06$ на различных временных интервалах. Все ДНК-логические ворота, включая 2i и 3iINHIBIT, соответствовали теоретическим предсказаниям согласно таблице истинности. Однако ворота INHIBIT показали полную отмену активности после

увеличения концентрации ингибирующего входного сигнала (input 4) в 2 и 3 раза (Рис. 7).

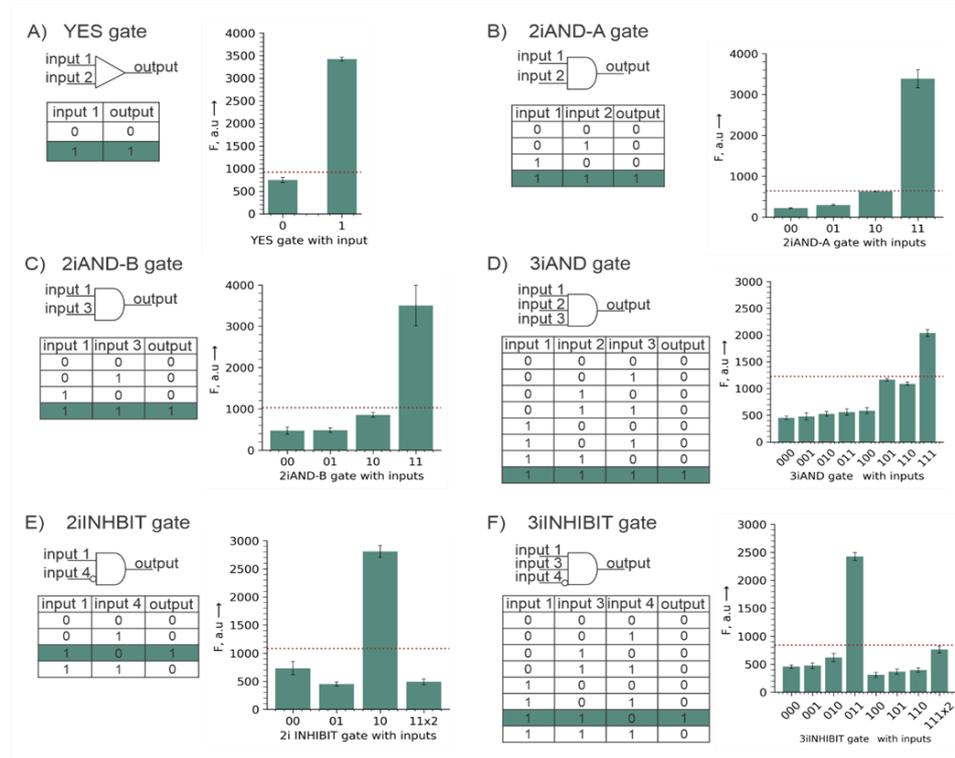


Рис. 7. Схемы логических операций, таблицы истинности и результаты расщепления F-sub для ДНК-конструкций на основе логических вентилей: 100 нМ ДНК-конструкции смешивали с 100 нМ входных сигналов (микроРНК) и 200 нМ F-sub, инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Наличие флуоресценции указывает на расщепление F-sub - выходной сигнал 1 и отсутствие флуоресценции - выходной сигнал 0, выше или ниже порога, установленного как три стандартных отклонения выше фонового значения. А) YES показал отношение сигнала к фону $4,58 \pm 0,36$ раз. В-D) 2iAND-A, 2iAND-B и 3iAND демонстрировали соотношение сигнала к фону: $3,00 \pm 0,34$ (7-50 мин), $2,3 \pm 0,8$ (5-15 мин) и $1,73 \pm 0,06$ (4-16 мин), соответственно. Е) 2iINHBIT показал соотношение сигнала к фону $1,73 \pm 0,06$ (6-8 мин), увеличиваясь до $3,22 \pm 0,12$ (6-60 мин) при удвоении концентрации 4-го входного сигнала (input 4). F) 3iINHBIT показал соотношение сигнала к фону $1,72 \pm 0,06$ (до 30 мин), увеличиваясь до $3,00 \pm 0,06$ (до 1 ч) при удвоении концентрации input 4.

Тестирование эффективности расщепления ДНК-конструкций на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО). Были разработаны три ДНК-конструкции на основе АСО: BiASO, 2i-A Th и 3i-A Th, которые продемонстрировали различные профили активации в ответ на концентрации miR-17. BiASO показал гиперболическую активность с плато при концентрациях выше 50 нМ, достигая максимальной активации при 50 нМ miR-17. 2i-A Th и 3i-A Th продемонстрировали сигмоидальные кривые активации с порогами активации при

7,5 и 39,5 нМ miR-17, соответственно. Максимальная активация для 2i-A Th и 3i-A Th наблюдалась при 100 и 150 нМ miR-17, соответственно. Эти результаты показывают, что пороговые механизмы могут эффективно модулировать активность расщепления РНК в широком диапазоне концентраций miR-17 (Рис. 8).

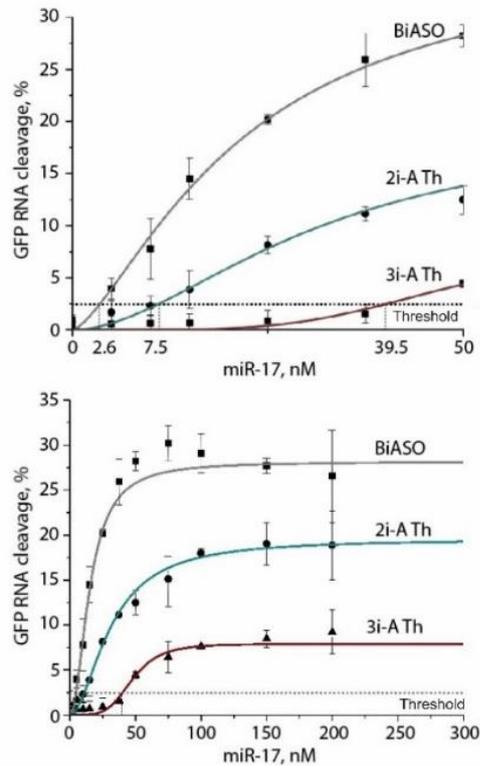


Рис. 8. Тестирование ДНК-конструкций на основе АСО с пороговой функцией. Расщепление РНК-60 (1000 нМ) с помощью РНКазы Н (0,5 U) в присутствии логических вентилей (50 нМ) в присутствии различных концентраций miR-17 в течение 20 мин при 37°C. Количественная оценка трех экспериментов по расщеплению и эффективность расщепления РНК GFP (%) при различных концентрациях miR-17 (0-500 нМ).

Спектрофотометрический анализ и определение предела обнаружения синтетического ДНК анализита SARS-CoV-2 с помощью ДНК-конструкций. Хотя бинарные biDz демонстрируют перспективные результаты, они сталкиваются с трудностями при работе с длинными РНК-аналитами из-за их стабильных вторичных структур. ДНК-конструкция с четырьмя участками связывания РНК (4DNM) улучшает свойства biDz, помогая раскручивать вторичные структуры РНК. Эти дополнительные участки соединены с ДНК-скаффолдом, стабилизируя гибридизацию ДНК-конструкции с целевой РНК и повышая чувствительность к аналиту. После тестирования конструкции на синтетическом фрагменте ДНК анализита и определения предела обнаружения (LOD) в 1 пМ, 4DNM и простой ViDz

были протестированы на вирусной РНК, извлечённой из инфицированных клеток. Результаты показали обнаружение вирусной РНК только с использованием 4DNM (Рис. 9). Кроме того, 4DNM продемонстрировал высокую селективность, обнаружив только РНК SARS-CoV-2, и не показал детектируемого сигнала с вирусной РНК OC43. Тестирование на клинических образцах выявило, что 4DNM успешно обнаружил 5 из 9 положительных клинических образцов с SARS-CoV-2, подтверждённых ПЦР (Рис. 10).

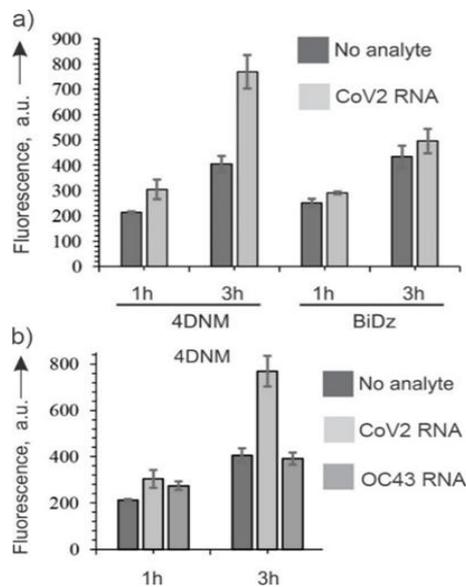


Рис. 9. 4DNM селективно обнаруживает CoV2-RNA. А) Тестирование 4DNM и BiDz с 125 пМ CoV2-RNA или в ее отсутствии. F-sub (200 нМ) инкубировали с BiDz (20 нМ Dza, 5 нМ Dzb) или DNМ (20 нМ Dza, 5 нМ комплекса T1/T2) и $3,8 \times 10^9$ молекул CoV2-RNA или OC43-RNA в реакционном буфере. Флуоресценцию при 517 нм ($\lambda_{ex} = 485$ нм) регистрировали через 1 или 3 ч инкубации при 55°C. (В) Селективность 4DNM в присутствии $3,8 \times 10^9$ молекул CoV2-RNA или OC43-RNA (125 пМ).

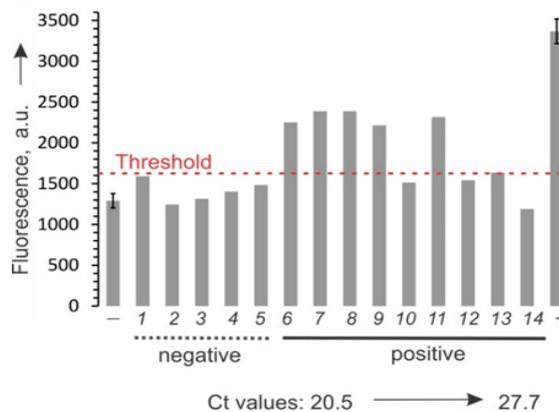


Рис. 10. Обнаружение вирусного РНК-аналита в клинических образцах с помощью 4DNM. Все образцы содержали F-sub (200 нМ) и 4DNM (20 нМ Dza и 5 нМ комплекса T1/T2) в реакционном буфере, инкубировали при 55°C в течение 3 ч. Положительный контроль (последний столбец) содержал 20 пМ синтетического аналита CoV2-DNA1. Измеряли

флуоресценцию при 517 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 485$ нм). Девять положительных и пять отрицательных образцов CoV-2 от 14 человек были подтверждены методом RT-qPCR с указанными значениями Ct. Значения Ct: 6-20.4; 7-21.0; 8-21.8; 9-22.0; 10-22.9; 11-24.2; 12-25.5; 13-25.9; 14-27.7. Образцы 1-14 были измерены один раз для обеспечения максимальной концентрации вирусной РНК, поэтому стандартные отклонения отсутствуют. Стандартные отклонения для отрицательного (-) и положительного (+) контроля получены в результате трех независимых измерений.

Спектрофотометрический анализ ДНК-конструкции (HDNM), оснащенной элементом доставки субстрата «крючком» нацеленной на COV2-DNA1, и обнаружение РНК SARS-CoV-2 среди тотальной РНК, выделенной из инфицированных клеток Vero. ДНК-конструкция с крючками (HDNM) оснащена ДНК-скафолдом (T1, T2, T3) и двумя крючками, которые могут связывать до трёх молекул F-sub каждая. HDNM работает оптимально при 55°C, повышая чувствительность обнаружения примерно в 180 раз по сравнению с 4DNM, с LOD 0,025 пМ после 3 ч инкубации (таблица 1).

Для более глубокого исследования возможностей ДНК-скафолдов была разработана MDNM, которая интегрирует несколько каталитических центров в одной наноструктуре, включая олигонуклеотиды T1, T2, T3 и T4, а также четыре свободных олигонуклеотида A10, A20, A30, A40, как часть каталитического центра. Этот дизайн улучшает обнаружение одной молекулы аналита и позволяет генерировать одновременно 4 сигнала в присутствии одного аналита. Включение дополнительных РНК-связывающих участков улучшает раскручивание длинных фрагментов аналита, генерацию флуоресцентного сигнала и общую чувствительность с LOD 0,3 пМ после 3 часов инкубации (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение LOD для различных ДНК-конструкций

Название ДНК-конструкции	LOD, 1 ч	LOD, 3 ч
BiDZ	-	10 пМ
4DNM для ДНК аналита	10 пМ	1 пМ
4DNM для РНК аналита	-	26 пМ
HDNM для ДНК аналита	0.063 пМ	0.025 пМ
HDNM для РНК аналита	26 пМ	2 пМ

MDNM для ДНК анализата	2.6 pM	0.3M
MDNM для РНК анализата	28 pM	5 pM

Это исследование продвигает ДНК-нанотехнологии, особенно в разработке автономных ДНК-нанороботов. На данный момент времени эксперименты с использованием ДНК-конструкций в живых клетках не проводились, и все представленные результаты касаются исключительно *in vitro* экспериментов в бесклеточной системе. Однако, эффективность и функционирование конструкций, продемонстрированные в этих условиях, являются важным шагом к их возможной применимости в клеточных системах. Дальнейшие исследования в клеточных моделях необходимы для проверки биологической активности и стабильности конструкций в условиях живых клеток. Потенциальные трудности, такие как доставка конструкций в клетки, устойчивость к клеточным нуклеазам и взаимодействие с внутриклеточными молекулами, безусловно, требуют дополнительного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработано 21 ДНК-конструкций на основе бинарных ДНКзимов (biDz) и 3 ДНК-конструкций на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО). ДНК-конструкции BiRDz, 2i-DTh, 3i-DTh, 4i-DTh и 5i-DTh активировали расщепление РНК-мишени при концентрации miR-92 равной 0.25, 20, 80, 90 и 190 нМ, соответственно. ДНК-конструкции, имеющие в своем составе ДНК-скафолд, такие как DNM, Th-DNM-2i-46 и Th-DNM-3i-46, активировались при 2, 25 и 55 нМ miR-17, соответственно. ДНК-конструкции BiASO, 2i-A Th и 3i-A Th активировались при концентрации miR-17 равной 2.6, 7.5 и 39.5 нМ, соответственно. Порог концентрации онкомаркерных микроРНК для активации ДНК-конструкций зависел от количества микроРНК-связывающих участков в составе ДНК-конструкций.

2. Разработаны 12 ДНК-конструкций на основе biDz, содержащих все функциональные олигонуклеотиды, прикрепленные к одному ДНК-скафолду и работающие по принципу логических вентилях. ДНК-конструкции YES, 2iAND-A

и 2iAND-B демонстрировали расщепление РНК-мишени с соотношением сигнал/фон 80.4, 10.3 и 39.2, соответственно, после 7 ч инкубации. ДНК-конструкции 3iAND, 2iINHIBIT и 3iINHIBIT демонстрировали расщепление РНК-мишени с соотношением сигнал/фон 18.3, 4.3, 3.9 и 26, соответственно, после 24 ч инкубации. ДНК-конструкции 2iINHIBIT и 3iINHIBIT показали полное ингибирование расщепления РНК-мишени после добавления онкосупрессора miR-7 в концентрации, превышающей концентрацию самой ДНК-конструкции в 1 и 2 раза, соответственно.

3. Были разработаны 3 ДНК-конструкции для обнаружения ДНК и РНК анализов SARS-Cov-2. ДНК-конструкция 4DNM, оснащенная двумя дополнительными РНК-связывающими участками, продемонстрировала предел обнаружения (LOD) равный 1 пМ синтетического ДНК анализата, что 20 раз ниже чем biDz после 3 ч инкубации. LOD для РНК анализата составило 26 пМ после 3 ч инкубации, тогда как biDz не смог обнаружить РНК. ДНК-конструкция HDNM с функцией доставки субстрата показала LOD равное 0,063 пМ и 0,025 пМ после 1 и 3 ч, соответственно. LOD для РНК-анализата составило 26 и 2 пМ после 1 и 3 ч, соответственно. ДНК-конструкция MDNM с четырьмя каталитическими центрами показала LOD для синтетического ДНК анализата 6.5, 2.6 и 0.3 пМ после 0.5, 1 и 3 ч, соответственно. LOD для РНК-анализата составило 28 пМ и 5 пМ после 1 и 3 ч, соответственно, и показывает улучшение чувствительности, так как 4DNM не обнаруживала вирусную РНК после 1 ч инкубации.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Результаты диссертационной работы могут быть использованы в разработке диагностических и терапевтических подходов для онкологических и вирусных заболеваний, а также позволяют расширить область применения ДНК-зондов в биомедицине. Возможно проведение дальнейшей модификации ДНК-конструкций для снижения порога чувствительности и увеличения эффективности расщепления РНК-мишеней, исследование влияния различных химических модификаций на стабильность и каталитическую активность конструкций. Также, перспективным направлением может быть исследование кинетики взаимодействия логических ДНК-конструкций

с микроРНК для прогнозирования времени отклика, адаптация технологий к современным платформам молекулярной диагностики, миниатюризация и интеграция ДНК-конструкций в портативные устройства для экспресс-анализа. Кроме того, необходимо продолжать исследования биосовместимости и разработку безопасных методов введения ДНК-конструкций в организм для возможного терапевтического применения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, индексируемых наукометрическими базами данных Scopus и Web of Science:

1. Nour M. RNase H-dependent DNA thresholder modulated by cancer marker concentration / Drozd V.S., Lemeshko E.A., Tafran L., Salimova A.A., Kulikova A.V., **Eldeeb A.A.** // *Chemical Communications*. – 2024. – Vol. 60, № 33. – P. 4427–4430. doi: 10.1039/d4cc00495g
2. Smirnov V.V. Towards the Development of a DNA Automaton: Modular RNA-cleaving Deoxyribozyme Logic Gates Regulated by miRNAs / Drozd V.S., Patra C.K., Hussein Z., Rybalko D.S., Kozlova A.V., Nour M., Zemerova T.P., Kolosova O.S., Kalnin A.Y., **El-Deeb A.** // *Analyst*. – 2024. – Vol. 149, № 6. – P. 1947– 957. doi: 10.1039/d3an02178e
3. Patra C. Thresholding DNA nanomachine as a highly cooperative and efficient enzyme-like system for controlled RNA cleavage / **Eldeeb A.A.** // *Chem. Med. Chem.* – 2023. – Vol. 18, № 7. – P. e202300040. doi: 10.1002/cmdc.202300040
4. Nour M.A. Distinguishing High from Low Concentrations of RNA Cancer Marker: Five-Input DNzyme Thresholding Gate / Kulikova A.V., Wanjohi J., **El-Deeb A.** // *Chemistry Select*. – 2023. – Vol. 8, № 48. – P. e202303011. <https://doi.org/10.1002/slct.202303011>
5. Hussein Z. DNzyme Nanomachine with Fluorogenic Substrate Delivery Function: Advancing Sensitivity in Nucleic Acid Detection /Nour M., Kozlova A.V., Kolpashchikov D.M., Komissarov A., **El-Deeb A.** // *Analytical Chemistry*. – 2023. – Vol. 95, № 51. – P. 18667–18672. doi: 10.1021/acs.analchem.3c04420
6. **El-Deeb A.** Toward a Home Test for COVID-19 Diagnosis: DNA Machine for Amplification-Free SARS-CoV-2 Detection in Clinical Samples / Zablotskaya S., Rubel M.S., Nour M., Kozlovskaya L., Shtro A., Komissarov A., Kolpashchikov D.M. // *Chem. Med. Chem.* – 2022. – Vol. 17, № 20. – P. e202200382. doi: 10.1002/cmdc.202200382

7. Gomes de Oliveira A. RNA-Cleaving DNA Thresholder Controlled by Concentrations of miRNA Cancer Marker / Dubovichenko M.V., **Eldeeb A.A.**, Wanjohi J., Zablotskaya S., Kolpashchikov D.M. // Chem. Bio. Chem. – 2021. – Vol. 22, № 10. – P. 1750–1754. doi: 10.1002/cbic.202000769

Публикации в других изданиях:

8. Хусейн З. Advancing DNA automation: miRNAs-regulated “NOT-gate” logic elements based on deoxyribozyme DNA machines / Смирнов В., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов X международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. – 2023. – P. 533–534.

9. Головина Л.А. Многоядерная ДНК-машина на основе бинарных дезоксирибозимов для безамплификационной детекции SARS-COV-2 / Хусейн З., Колпащиков Д.М., Комиссаров А.Б., **Эльдиб А.А.** // Сборник научных трудов 4-й международной конференции «Современные достижения химикобиологических наук в профилактической и клинической медицине», посвященной 135-летию со дня рождения профессора В. В. Лебединского. – 2023. – № 56. – С. 24–30.

10. Головина Л.А. Multicore DNA-machine based on binary deoxyribozyme for amplification-free detection of SARS-COV-2 / Хусейн З., Комиссаров А.Б., Колпащиков Д.М., **Эльдиб А.А.** // Сборник тезисов X международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. – 2023. – С. 531–532.

11. Головина Л.А. ДНК-машины на основе бинарных дезоксирибозимов как перспективный инструмент безамплификационной диагностики SARS-CoV-2 / Хусейн З., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М., Комиссаров А.Б. // Вирусные инфекции – от диагностики к клинике: сборник тезисов Всероссийской конференции молодых ученых. – 2023. – С. 30–31.

12. Головина Л.А. ДНК-машина с несколькими каталитическими центрами на основе дезоксирибозима для безамплификационного детектирования SARS-COV-2 / Хусейн З., **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Материалы XXVI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. – 2023. – С. 34–35.

13. Хусейн З. Antenna-equipped deoxyribozyme machine for ultra-sensitivity amplification-free detection of SARS-COV-2 RNA / **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов IX международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. – 2022. – P. 694–695.

14. Хусейн З. Antenna-equipped deoxyribozyme-based DNA machine for ultra-sensitivity detection of SARS-COV-2 RNA / **Эльдиб А.А.**, Колпащиков Д.М. // Материалы всероссийской конференции: Синтетическая биология и биофармацевтика. – 2022. – P. 147.

15. Смирнов В. Разработка логического вентиля «INHIBIT GATE» на основе бинарного дезоксирибозима / Дрозд В.С., Лаушкина В.О., Васильева Т.В., Кальнин А.Ю., Эльдиб А.А., Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов 25-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». – 2022. – С. 144.

16. Головина Л.А. ДНК машина с несколькими каталитическими центрами на основе дезоксирибозима для безамплификационной детекции SARS-COV-2 / Хусейн З., Эльдиб А.А. // Неделя науки 2022: материалы Международного молодёжного форума. – 2022. – С. 760–761.

17. Мустафа А. Distinguishing high from low concentrations of RNA cancer marker: 5-input binary deoxyribozyme thresholding gate / Ванджои Д., Эльдиб А.А., Колпащиков Д.М. // Сборник тезисов: Конференция Новосибирского национального исследовательского государственного университета. – 2021. – С. 253–254.

18. Smirnov V. Development of protections for antisense and binary antisense agents / Nedorezova D.D., Drozd V.S., Eldeeb A.A., Kolpashchikov D.M. // Сборник тезисов VIII международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. – 2021. – С. 143.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная РНК

LOD - (англ. Levels of Detail) – предел обнаружения

miR – микроРНК

SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) — оболочечный одноцепочный (+) РНК-вирус, относящийся к подроду *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus*

ВНҚ-1 – (Black Hole Quencher) - это нефлуоресцентный темный гаситель, который можно добавить к 3'-концу олигонуклеотида

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Клетки Vero - являются одной из наиболее часто используемых непрерывных линий клеток млекопитающих в исследованиях молекулярной и клеточной биологии

HEPES - (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) представляет собой цвиттер-ионный органический буферный агент

Эльдиб Ахмед Абделкадер Мохамед Отман

РАСПОЗНАВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ДНК НАНОКОНСТРУКЦИЙ

В данном исследовании ДНК-конструкции на основе biDz были разработаны для (i) различения низких и высоких концентраций последовательностей РНК раковых маркеров; (ii) распознавания нескольких последовательностей биомаркеров; и (iii) обнаружения низких концентраций вирусного РНК анализата без его предварительной амплификации.

Расщепление целевой РНК *in vitro* было достигнуто с помощью ДНК-конструкций на основе BiDz и антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) в присутствии разных концентраций miR-17 и miR-92. Были разработаны ДНК-конструкции с булевыми логическими функциями YES, 2AND, 3AND, 2 iINHIBIT и 3 iINHIBIT, содержащие все функциональные компоненты каждого отдельного логического вентиля, присоединенные к универсальному ДНК-скаффолду. Расщепление целевой РНК достигалось различными комбинациями miR15, miR17, miR 21, miR 7 в соответствии с таблицами истинности. ДНК-конструкции на основе BiDz, оснащенные двумя дополнительными сайтами для разворачивания РНК, и ДНК-конструкции со множеством РНК-расщепляющих каталитических центров показали более низкий предел обнаружения (LOD) по сравнению с обычным сенсором biDz. Функция доставки флуорогенного субстрата также улучшила LOD ДНК-конструкций для обнаружения синтетических ДНК и РНК анализатов.

Таким образом, сложные многокомпонентные ДНК-конструкции могут эффективно распознавать РНК, закладывая основу для применения ДНК-нанотехнологий и молекулярных ДНК-нанороботов для обнаружения и лечения заболеваний.

El-Deeb Ahmed Abdelkader Mohamed Othman

RECOGNITION OF NUCLEIC ACIDS USING MULTICOMPONENT DNA NANOCONSTRUCTS

In this study, DNA Constructs based on biDz was adopted for (i) differentiation low from high concentrations of cancer marker RNA sequences; (ii) recognition of multiple biomarker sequences; (iii) detecting low concentrations of viral RNA in amplification free format.

In vitro RNA cleavage was achieved by biDz-based DNA Constructs and antisense oligonucleotide (ASO)-based DNA Constructs in the presence of different concentrations of miR-17 and miR-92. DNA Constructs with YES, 2AND, 3AND, 2 iINHIBIT and, 3 iINHIBIT Boolean logic functions were developed containing all the functional components of each individual gate attached to an individual DNA scaffold. RNA cleavage was achieved by a different combination of miR15, miR17, miR 21, miR 7 according to the truth tables. BiDz-based DNA Constructs equipped with 2 additional RNA-unwinding arms and multicore biDz-based DNA Construct showed decreased LOD than that demonstrated by conventional biDz sensor. The fluorogenic substrate delivery function as well improved LOD of biDz-based DNA Constructs for synthetic DNA and RNA analyte detection.

Thus, complex multicomponent DNA Constructs can effectively RNA, laying the groundwork for applying DNA nanotechnology and molecular DNA nanorobots in disease detection and therapy.