

Abstrakt

Nedávná pandemie SARS-CoV-2 ukázala, že lidstvo mohou ohrozit i tak jednoduché organismy, jako jsou viry. Tato krize zdůraznila potřebu včasné a spolehlivé diagnostiky a také rychlého objevu účinných léků proti novým nemocem. Navrhujeme, že obě tyto výzvy lze řešit pomocí deoxyribozymů (katalyticky aktivních molekul DNA).

Nejběžnějšími typy signálů jsou světlo, fluorescence, barva a radioaktivita. Některé z těchto signálů mohou být generovány deoxyribozomy, jiné však zatím nikoli. Funkční molekula DNA, která generuje robustní fluorogenní nebo chromogenní signál, by měla pro mnoho aplikací značné výhody ve srovnání s fluorescenčními proteiny, jejichž syntéza je nákladná a pracná, a fluorescenčními RNA aptamery, které jsou náchylnější k degradaci než molekuly DNA. Abychom rozšířili spektrum možných signálů generovaných pomocí DNA, použili jsme *in vitro* selekci k vývoji deoxyribozymů, které generují silné fluorogenní a chromogenní signály.

Deoxyribozomy, které generují fluorogenní signál, toho dosahují defosforylací kumarinového substrátu 4-methylumbelliferylfosfátu (4-MUP). Přenášejí fosfátovou skupinu z 4-MUP na svou vlastní 5' hydroxylovou skupinu. Touto reakcí se nefluorogenní 4-MUP mění na fluorogenní 4-methylumbelliferon (4-MU). Nejaktivnější deoxyribozym identifikovaný v našich studiích jsme pojmenovali Aurora. Ten zvyšuje fluorescenci více než 700krát a vytváří detekovatelný signál během několika minut. Deoxyribozomy, které produkují žlutou barvu, přenášejí fosfátovou skupinu z bezbarvého substrátu 4-nitrofenylfosfátu (4-NPP) na vlastní 5' hydroxylovou skupinu. Po defosforylaci se 4-NPP přemění na žlutý 4-nitrofenol (4-NP). Tento deoxyribozym jsme pojmenovali Apollon. Apollon zvyšuje chromogenní signál více než 100krát.

Pro zlepšení katalytické aktivity Aurory a Apollona, pro identifikaci jejich minimalizovaných verzí a k řešení jejich sekundárních struktur jsme použili *in vitro* selekci v kombinaci s vysokokapacitním sekvenováním a komparativní sekvenční analýzou. Dále jsme pro dosažení co nejlepšího poměru signál k šumu podrobně charakterizovali reakční podmínky, včetně vlivu různých jedno- a dvojmocných iontů, různých pufrů, molekulárních zahušťovadel a různých hodnot pH, jakož i různých koncentrací substrátu a deoxyribozymu.

Dále jsme vyvinuli několik způsobů, jak přeměnit Auroru a Apollona na alostericky regulované senzory. Aurora a Apollon byly navrženy tak, aby fungovaly jako

oligonukleotidové senzory pro specifické sekvence a také jako senzory pro různé typy nukleáz v homogenních testech, které nevyžadují promývání nebo následné purifikační kroky. Upravená verze Aurory může detekovat pikomolární koncentrace ribonukleáz a byla použita k rychlé identifikaci nových nízkomolekulárních inhibitorů ribonukleázy Nsp15 ze SARS-CoV-2 ve vysoce kapacitním testování. Naše výsledky ukazují, že deoxyribozomy mohou generovat robustní fluorogenní a chromogenní signály a že takové deoxyribozomy lze použít v aplikovaném výzkumu k řešení aktuálních problémů.

Klíčová slova: deoxyribozym, *in vitro* selekce, senzor, aptazym, fluorescence, 4-methylumbelliferylfosfát, kolorimetrický, chromogenní, 4-nitrofenylfosfát, homogenní test, RNáza A, Nsp15, SARS-CoV-2