

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Алиева Ругия Шахрияр кызы

**Нековалентные димеры аптамеров к тромбину и
рецептору эпидермального фактора роста**

Специальность 1.4.9 – Биоорганическая химия (химические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва

2022

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научные руководители:

Копылов Алексей Михайлович

доктор химических наук, профессор

Завьялова Елена Геннадиевна

кандидат химических наук

Официальные оппоненты:

Тишков Владимир Иванович

доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», химический факультет, кафедра химической энзимологии, профессор

Варижук Анна Михайловна

доктор химических наук, заведующая лабораторией структуры и функций биополимеров, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Воробьева Мария Александровна

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии РНК, ФГБУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «07» февраля 2023 г. в 16 ч. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИФХБ, ауд.501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп. д.27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/509275366/>

Автореферат разослан «___» декабря 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Аптамеры представляют собой одноцепочечные ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, которые обладают высокой селективностью и сродством к мишеням. Эти свойства обусловлены уникальной третичной структурой аптамеров, включающей такие мотивы, как шпильки, G-квадруплексы и псевдоузлы.

Мультимерный аптамер можно определить, как конструкцию из двух или более одинаковых или разных аптамеров (модулей). Соединение нескольких модулей может значительно улучшить свойства конструкции благодаря многоточечному связыванию с мишенью. Для создания димерных конструкций могут быть использованы подходы конструирования с использованием как соединения олигонуклеотидов линкерами, так и нековалентных взаимодействий нуклеиновых кислот. Ковалентная димеризация аптамеров хорошо изучена, в некоторых случаях показано уменьшение ингибирующей активности модулей за счет изменения конформации аптамера в димерной конструкции.

Для нековалентной димеризации чаще всего использовались комплементарные фрагменты, образующие дуплексы. Нековалентная димеризация аптамеров с помощью G-квадруплексов широко не изучена. Показано, что димеры с межмолекулярным G-квадруплексом (аптамеры к тромбину GL1 и GL2, на основе аптамера HD1) сохраняют высокую ингибирующую активность аптамера HD1 и улучшают его фармакодинамические свойства *in vivo* за счет увеличения молекулярной массы.

G-квадруплекс-содержащий тромбин-связывающий 15-звенный аптамер HD1, известный как TBA или ARC-183, является наиболее охарактеризованным аптамером к тромбину. HD1 – модельный объект для изучения влияния новых химических модификаций на свойства аптамеров, а также влияния дополнительных модулей на функциональность аптамерного модуля.

Особый интерес представляет изучение димерных аптамеров к димерным мишеням. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), относится к рецепторам тирозиновых протеинкиназ и играет ключевую роль в регуляции многочисленных процессов разных типов клеток, включая дифференцировку, пролиферацию и апоптоз. Избыточная активность EGFR связана с различными типами рака, включая рак кожи, рак легких и др. Были разработаны аптамеры к EGFR, которые могут быть использованы как ингибиторы рецептора или в качестве средства доставки других ингибиторов в клетки с повышенной экспрессией EGFR. Димеризация аптамеров может привести к увеличению их аффинности к димерной форме EGFR, что может быть практически значимым в терапии некоторых типов рака.

Степень разработанности темы

Описано несколько удачных вариантов нековалентной димеризации аптамеров. Димерные конструкции аптамеров были предложены как антикоагулянты с увеличенной продолжительностью циркуляции аптамера в крови *in vivo*. Два аптамера HD1 были связаны с помощью межмолекулярного G-квадруплекса; полученные аптамеры сохраняли высокую ингибирующую активность, обладая измененной фармакодинамикой *in vivo* за счет увеличения молекулярной массы. Структура и аффинность к тромбину предложенных димерных конструкций на основе аптамеров к тромбину ранее не были охарактеризованы; выходы димерных конструкций ранее не были определены.

Нековалентные димерные конструкции на основе аптамеров к EGFR были собраны с помощью межмолекулярных дуплексов (14-24 п.о.) для увеличения аффинности аптамера к мишени. Показано, что сродство димеров аптамеров к EGFR к клеткам линии A431 сохраняется. В литературе отсутствует сравнительный анализ способов димеризации аптамеров, обосновывающий достоинства и недостатки разных стратегий димеризации.

Цели и задачи исследования

Цель данной работы – создание нековалентных димеров аптамеров на основе межмолекулярных дуплексов и G-квадруплексов к тромбину и EGFR для улучшения функциональных свойств аптамеров.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Конструирование димеров ДНК-аптамеров к тромбину с помощью межмолекулярных дуплексов и G-квадруплексов.
2. Получение димеров ДНК- и РНК-аптамеров к EGFR, с помощью межмолекулярных дуплексов.
3. Разработка методики для количественного определения выхода димерных конструкций аптамеров.
4. Исследование термической стабильности димеров аптамеров к тромбину.
5. Определение аффинности и ингибирующей активности ковалентных и нековалентных димерных аптамеров к тромбину.
6. Оценка сродства и локализации димерных и мономерных аптамеров к EGFR в клетках линии A431.

Объект исследования

ДНК-аптамеры к тромбину, ДНК- и РНК-аптамеры к EGFR.

Предмет исследования

Функциональные свойства нековалентных димеров аптамеров к тромбину и рецептору эпидермального фактора роста (EGFR).

Научная новизна исследования

Впервые получены данные о структуре, стабильности, аффинности и ингибирующей активности нековалентных димеров ДНК-аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом. Проведён сравнительный анализ аффинности нековалентных гомодимеров аптамерных конструкций, образованных с помощью межмолекулярных G-квадруплексов или дуплексов. Разработана методика для количественной оценки выхода олигомеров на основе эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Оценено сродство димеров ДНК- и РНК- аптамеров к EGFR и локализация димеров в клетках линии A431.

Теоретическая значимость исследования

Результаты данного исследования способствуют пониманию эффективности конструирования олигомерных ДНК- и РНК-аптамеров с помощью разных межмолекулярных конструкций, влияния типа соединения на функциональную активность и сродство аптамеров к мишеням.

Практическая значимость исследования

Нековалентные олигомеры аптамеров могут быть использованы для создания ДНК-наноконструкций, узнающих несколько мишеней. Такие конструкции могут быть получены без потери выхода при синтезе и с сохранением или увеличением аффинности и функциональной активности.

Методология диссертационного исследования

При проведении экспериментов использовали современные биохимические, физико-химические, молекулярно-биологические методы. Количественная оценка степени олигомеризации проведена методом эксклюзионной ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 HPLC с колонкой TSKgel G2000SWXL в условиях, близких к нативным. Термическую стабильность и топологию G-квадруплексов, а также термическую стабильность дуплексов определяли методом плавления (определение зависимости отклика от температуры с детекцией методом кругового дихроизма для G-квадруплексов и УФ-спектроскопии для дуплексов). Ингибирующую активность аптамеров к тромбину оценивали с помощью теста коагуляции плазмы крови человека, комплексообразование с помощью интерферометрии биослоев на приборе Blitz, Octet Red96. Спектры ядерного магнитного резонанса получены на приборах Bruker AVANCE III HD 300 (ИМБ РАН им. В.А.Энгельгардта). Сродство аптамеров к EGFR было оценено с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе BD Accuri C6 (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН). Уровень пролиферации клеток в присутствии аптамеров был оценен с помощью МТС теста (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН). С помощью конфокальной микроскопии с использованием микроскопа Carl Zeiss серии LSM-710 был проведен анализ локализации мономерных и димерных аптамеров к EGFR в

клетках линии A431 (НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н. Н. Бурденко). Статистическую обработку данных выполняли при помощи программного обеспечения Pro-Data Chirascan, Blitz Pro 1.3, Microsoft Excel 2019 и OriginPro 2020.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Димеризация 15-звенного G-квадруплексного аптамера к тромбину возможна путем образования межмолекулярного G-квадруплекса.
2. По данным ВЭЖХ выход нековалентных димеров выше у конструкций с межмолекулярным дуплексом по сравнению с конструкциями с межмолекулярным G-квадруплексом, в то время как аффинность к тромбину выше у димеров аптамеров с межмолекулярным G-квадруплексом.
3. Средство к клеткам линии A431 сопоставимо для мономерных аптамеров и нековалентных димеров ДНК- и РНК-аптамеров, образованных за счет межмолекулярного дуплекса. Димеры ДНК-аптамеров к EGFR интернализуются в ядра клеток линии A431 с наибольшей эффективностью.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании и с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030).

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (14 октября 2021 г.), а также на научных мероприятиях и конференциях в виде устных докладов: XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2018", Россия, г Москва, 9-13 апреля 2018; XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2019" Россия, г Москва, 8-12 апреля 2019; II Всероссийская конференция "Химия биологически активных веществ", Россия г Саратов, 21-25 октября 2019.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 3 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus. В научных публикациях (Alieva R., *et al.*, Mendeleev Communications. 2019 и Alieva R., *et al.*, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2021) автор принимал активное участие в постановке задач, выполнении экспериментов (в том числе в исследовании структуры и функции аптамеров,

создании методики для определения степени олигомеризации), анализе данных и подготовке публикаций. В публикации (Zavyalova E., Legatova V., Alieva R., *et al.*, *Biomolecules*. 2019) автор принимал участие в выполнении и описании экспериментов по эксклюзионной ВЭЖХ.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключался в сборе и анализе данных из литературы, планировании и проведении экспериментов, анализе и оформлении полученных результатов, представлении результатов на научных мероприятиях.

Структура и объём диссертации

Текст диссертации состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы, который включает 129 источников. Объём диссертации 108 страниц, материал иллюстрирован 32 рисунками и содержит 11 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот можно использовать для разработки мультивалентных систем путём сборки с использованием межмолекулярных конструкций («замков») различной природы. Межмолекулярные G-квадруплексы были тщательно изучены, однако их использование в качестве «замка» в межмолекулярных конструкциях ограничено. В данной работе мы приводим первые данные о структуре, ингибирующей активности, аффинности и выходе нековалентных димеров аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом. Проведен анализ функциональной активности и аффинности предложенных конструкций в сравнении с ковалентными и нековалентными димерами с межмолекулярным дуплексом. Для повышения аффинности мономерных аптамеров к EGFR были созданы димерные конструкции ДНК- и РНК-аптамеров к EGFR. Выход димерной конструкции оценен с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Исследована антипролиферативная активность/цитотоксичность и сродство к клеткам в сравнении с мономером. С помощью конфокальной микроскопии получены данные, позволяющие оценить локализацию аптамеров в клеточной линии A431.

I. Нековалентные димеры аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом и дуплексом

Аптамер HD1 был димеризован с помощью межмолекулярного G-квадруплекса и дуплекса (Рис. 1А). Посредством олигонуклеотидного линкера аптамер был соединен с гуанин-богатой последовательностью, способной образовать межмолекулярный димер за счет образования антипараллельного G-квадруплекса.

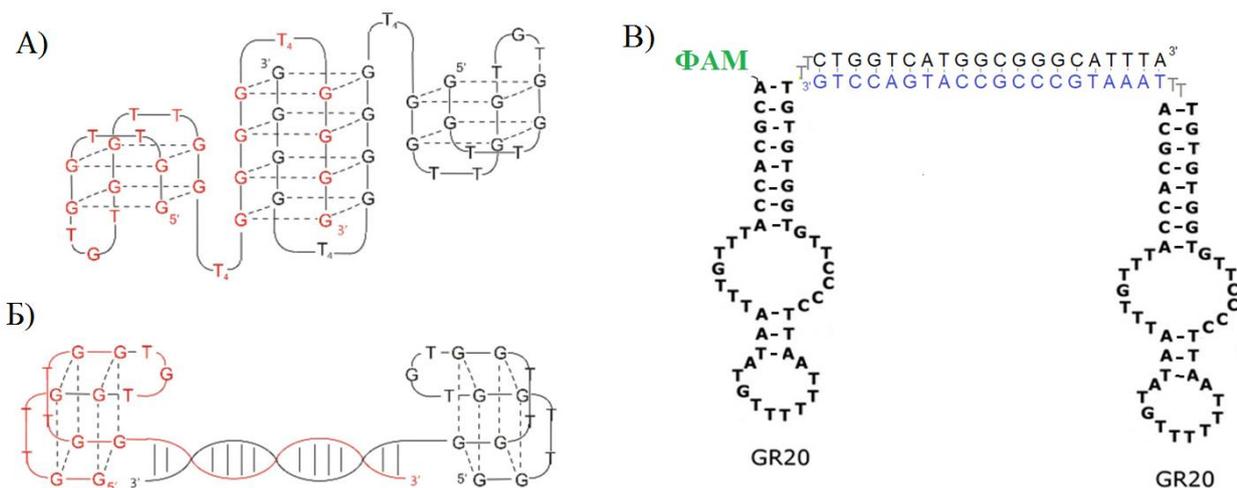


Рисунок 1. Предполагаемые структуры нековалентных димеров аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом, T4T4(A), дуплексом dHD1-14ds (Б) и димера ДНК-аптамера к EGFR, dGR20-20ds, с межмолекулярным дуплексом (B).

Для изучения влияния длины линкера, состоящего из тиминов, соединяющего аптамерный модуль и G-квадруплексный «замок», предложены последовательности аптамеров, представленные на таблице 1 (T3T4, T4T4, T5T4), которые имеют 3T, 4T, 5T в линкере. Для изучения состава петли G-квадруплексного «замка» предложены последовательности аптамеров, представленные на таблице 1 (T4T3, T4TGT, T4TTGTT), у которых петля G-квадруплексного «замка» имела последовательности T4T3, TGT, TTGTT.

Таблица 1. Последовательности ДНК-аптамеров к тромбину.

Аптамер	Последовательность (5'→3')
HD1	GGTTGGTGTGGTTGG
RA36	GGTTGGTGTGGTTGG-T-GGTTGGTGTGGTTGG
T12-HD1-T12	T ₁₂ -GGTTGGTGTGGTTGG-T ₁₂
T3T4	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₃ G ₄ T ₄ G ₄
T4T4	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ T ₄ G ₄
T4T3	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ T ₃ G ₄
T5T4	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₅ G ₄ T ₄ G ₄
T4TGT	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ TGTG ₄
T4TTGTT	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ TTGTTG ₄
HD1-TT-14ss	GGTTGGTGTGGTTGG-TTCGAACGTGACATCG
HD1-TT-c14ss	GGTTGGTGTGGTTGG-TTCGATGTCACGTTCCG
HD1-c14ss-T4T4	GGTTGGTGTGGTTGG-AACCCCAAACCCCAA

Необходимо охарактеризовать выход и структуру предложенных конструкций, поскольку и аптамерный модуль и межмолекулярный «замок» являются G-квадруплексами и возможно образование альтернативных вариантов G-квадруплексов, что приведет к наличию нескольких конформаций наноконструкций.

Помимо димеризации с помощью G-квадруплексов, была предложена димеризация с помощью межмолекулярного дуплекса (дуплексный «замок»), в котором «хвосты» из 16-ти нуклеотидов, образуют дуплекс, димеризуя аптамеры (HD1-TT-14ss + HD1-TT-c14ss = dHD1-14ds; T4T4 + HD1-c14ss(T4T4) = dHD1-14ds-T4T4). Аптамерный модуль и дуплексный «замок» соединены между собой линкером из двух тиминнов. Исследовано влияние типа межмолекулярного «замка» на сборку димерных наноконструкций, ингибирующую активность и аффинность.

Разработка методики количественной оценки выхода димерных конструкций и расчет степени олигомеризации аптамеров

На основе эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) разработана методика количественной оценки выхода димерных конструкций. Концентрация соли не менее 200 мМ – необходимое условие для эффективного разделения с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Разделение проводили в двух подвижных фазах (ПФ) с высоким и низким содержанием ионной силы фосфатов калия (ПФ1: 60 мМ KH_2PO_4 , 140 мМ K_2HPO_4 pH 6,85 и 10 об.% ацетонитрила; или ПФ2: 11 мМ KH_2PO_4 , 9 мМ K_2HPO_4 , pH 6,85, 160 мМ Na_2SO_4 и 10 об.% ацетонитрила). Сравнение разных ПФ необходимо, поскольку катионы калия стабилизируют G-квадруплексы.

Для калибровки колонки была проведена эксклюзионная ВЭЖХ набора дуплексов разной длины от 10 до 300 пар оснований (п.о.). На рисунке 2 показаны зависимости относительного объема удерживания (v_R/v_0) от молекулярной массы дуплексов разной длины в двух подвижных фазах с высоким и низким содержанием ионной силы фосфатов калия (ПФ1: 60 мМ KH_2PO_4 , 140 мМ K_2HPO_4 pH 6,85 и 10 об.% ацетонитрила; или ПФ2: 11 мМ KH_2PO_4 , 9 мМ K_2HPO_4 , pH 6,85, 160 мМ Na_2SO_4 и 10 об.% ацетонитрила).

По этим данным была построена градуировочная кривая с диапазоном линейности ($R^2 = 0,99$) от 10 до 100 п.о. Для подвижной фазы ПФ2 линейный диапазон был аппроксимирован уравнением $\log_{10}M = -1,6 v_R/v_0 + 6,4$ которое было использовано для оценки степени олигомеризации димерных конструкций. «Степень олигомеризации» соответствует числу олигонуклеотидов в конструкции. Ширина пиков в ПФ2 больше, чем в ПФ1, что указывает на лучшие условия разделения в последней. Однако, при инкубации димерной конструкции в ПФ1 наблюдалось большое количество олигомеров G-квадруплексов (Рис. 3).

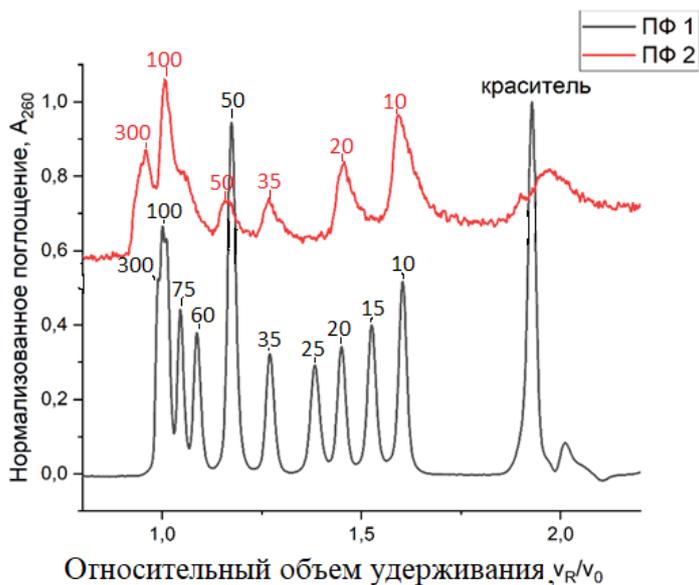


Рисунок 2. Влияние состава подвижной фазы на эффективность разделения дуплексов разной длины (10-300 п.о.). ПФ1 (60 мМ KH_2PO_4 , 140 мМ K_2HPO_4 pH 6,85 и 10 об.% ацетонитрила) - черная линия и ПФ2 (11 мМ KH_2PO_4 , 9 мМ K_2HPO_4 , pH 6,85, 160 мМ Na_2SO_4 и 10 об.% ацетонитрила) - красная линия.

Было проведено исследование влияния буфера для сборки ДНК-конструкций на выход фракции димеров (Рис. 3).

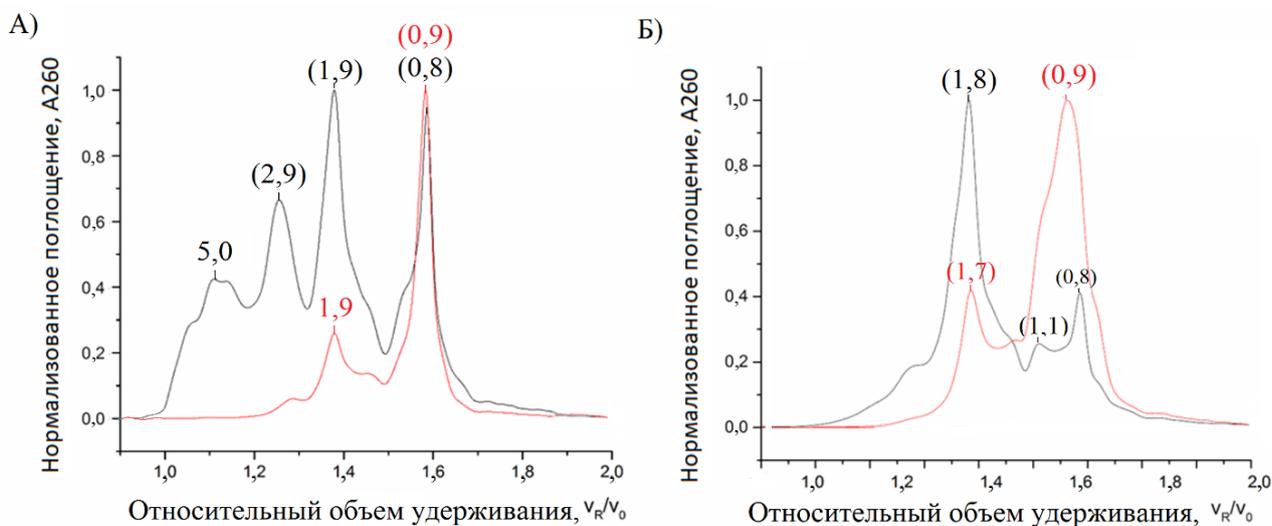


Рисунок 3. Влияние состава буфера на олигомерный состав димерных конструкций. Конструкции T4TGT (А) и T4TTGTT (Б) в двух разных буферах: высокой концентрацией фосфатов калия (ПФ1: 60 мМ KH_2PO_4 , 140 мМ K_2HPO_4 pH 6,85 и 10 об.% ацетонитрила), с низкой концентрацией фосфатов калия (ПФ2: 11 мМ KH_2PO_4 , 9 мМ K_2HPO_4 , pH 6,85, 160 мМ Na_2SO_4 и 10 об.% ацетонитрила) красная линия. Рассчитанные степени олигомеризации указаны в скобках.

Показано, что высокие концентрации фосфатов дестабилизируют димерные конструкции (Рис. 4А,Б,Г), что приводит к образованию смеси олигомеров в процессе хроматографического разделения (Рис. 3А). Наибольший выход димерных G-квадруплексов наблюдался в отсутствие

фосфатов (Рис. 4Д). Для дальнейшей работы была выбрана подвижная фаза ПФ2 с низким содержанием ионов фосфата калия.

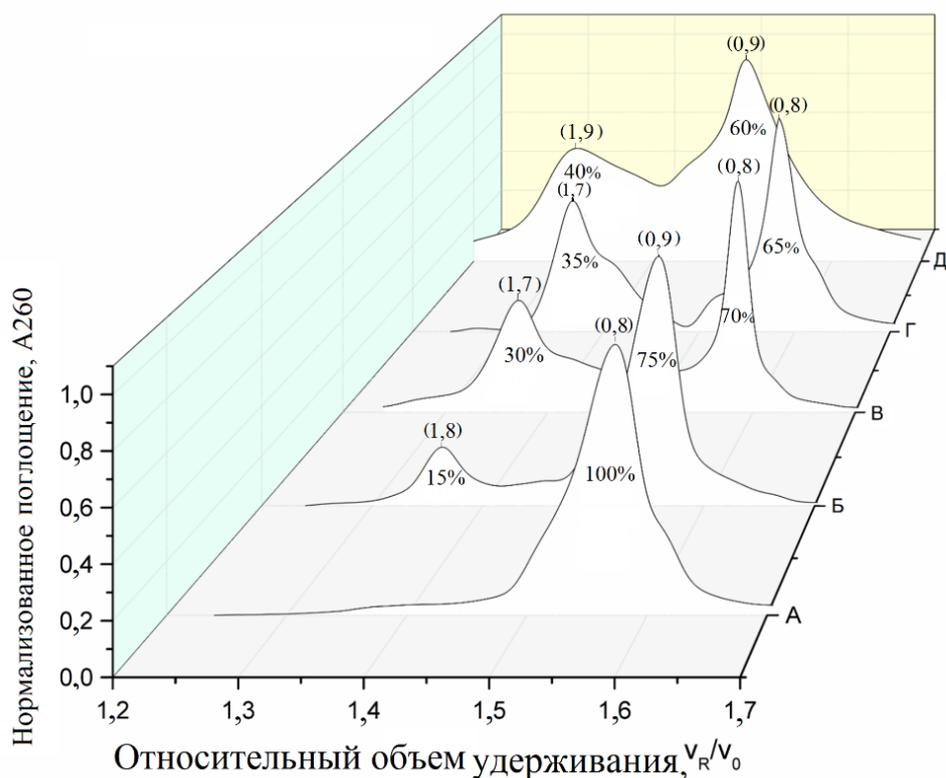


Рисунок 4. Сравнение выхода димерной конструкции Т4Т4, собранной в различных буферах и подвижных фазах: в подвижной фазе 1 с высокой концентрацией K^+ , А – 160 мМ Na_2HPO_4 , 20 мМ KH_2PO_4 ; Б – 60 мМ KH_2PO_4 , 140 мМ K_2HPO_4 ; В – 20 мМ Трис·HCl, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl; Г – 160 мМ Na_2SO_4 , 20 мМ KCl. В подвижной фазе 2 с низкой концентрацией K^+ Д – Т4Т4 собран в 20 мМ Трис·HCl, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl. Рассчитанные степени олигомеризации указаны в скобках.

Оценка выхода нековалентных димеров G-квадруплексного аптамера к тромбину

Нековалентный димер HD1, конструкция Т4Т4, образован с помощью межмолекулярного G-квадруплекса. Для оптимизации условий сборки, аптамер Т4Т4 собирали при разных концентрациях олигонуклеотида (10 мкМ, 100 мкМ, 1000 мкМ) в фосфатном буфере, содержащем 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl (Рис. 5). При концентрации Т4Т4 (10 мкМ) образование димера не происходит, наблюдается единственный пик с $v_R/v_0 = 1,56$, который соответствует мономеру. При увеличении концентрации Т4Т4 в 10 раз, до 100 мкМ, на хроматограмме наблюдали два пика. Помимо основного пика, который соответствует мономеру с тем же $v_R/v_0 = 1,56$, появился минорный пик (4%) димера с $v_R/v_0 = 1,35$. Дальнейшее увеличение концентрации

T4T4 до 1000 мкМ увеличивало выход димера до 50%. Таким образом, выход димера T4T4 увеличивается с возрастанием концентрации олигонуклеотида.

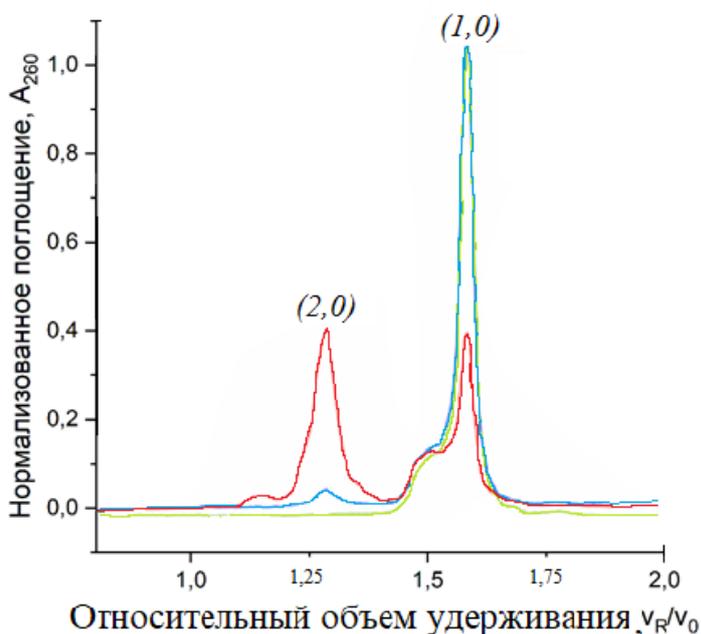


Рисунок 5. Оценка выхода димерной конструкции T4T4 с межмолекулярным G-квадруплексом методом эксклюзионной ВЭЖХ. Конструкция T4T4 была собрана в концентрациях: 10 мкМ (зеленая линия), 100 мкМ (синяя линия) и 1000 мкМ (красная линия). Рассчитанные степени олигомеризации указаны в скобках.

Сборка димерной конструкции T4T4 с межмолекулярным G-квадруплексом была оптимизирована изменением последовательности, образующей межмолекулярный G-квадруплекс, а также линкера между ним и аптамерным модулем. Количество тиминов в линкере между аптамерным модулем и G-квадруплексным замком изменялась от 3 до 5. Выход димера с линкером, состоящим из 3 тиминов на 10% выше, чем с линкерами из 4 и 5 тиминов (Рис. 6А).

Структура петли G-квадруплексного «замка» оказывает более выраженное влияние на димеризацию (Рис. 6Б). G-квадруплексные «замки» с петлями TGT и TTGTT дают выход димера 60%, т.е. на 20% выше по сравнению с замками с петлей TTTT (Рис. 6Б). Этот эффект может быть объяснен стабилизацией межмолекулярного G-квадруплекса за счет стэкинга с гуанином из петли.

Димерные конструкции аптамеров с межмолекулярным дуплексом

Для димеризации аптамера с помощью дуплекса к аптамерному модулю HD1 с одноцепочечным фрагментом из 14 нуклеотидов (аптамер HD1-TT-14ss, Рис. 7Б, красная линия) добавили аптамерный модуль HD1 с комплементарной последовательностью к одноцепочечному фрагменту (HD1-c-14ss). Таким образом, был получен димер аптамера с дуплексным «замком» dHD1-14ds.

Аналогично, к конструкции T4T4 с аптамерным модулем HD1 и одноцепочечным фрагментом из 14 нуклеотидов был добавлен аптамерный модуль HD1 с комплементарной последовательностью к одноцепочечному фрагменту (HD1-c14ss-T4T4). Эти 2 молекулы

образуют димерную конструкцию HD1 с межмолекулярным дуплексом (dHD1-14ds-T4T4) (Рис. 1Б). Образование межмолекулярного дуплекса проходило с большим выходом, чем образование межмолекулярного G-квадруплекса (Рис. 7А,Б).

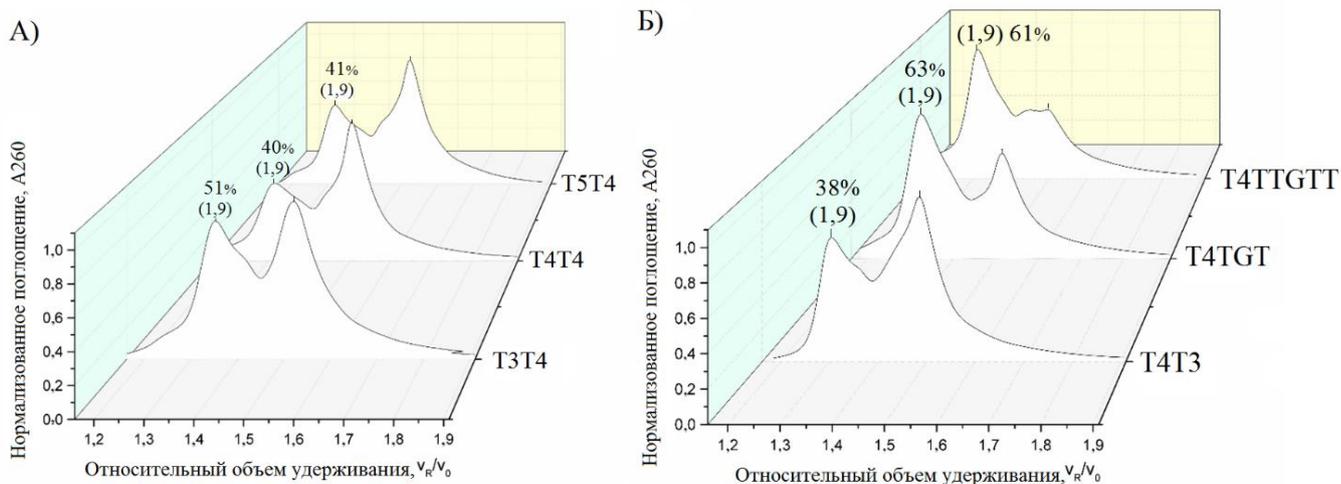


Рисунок 6. Влияние длины линкера (А) (конструкции Т3Т4, Т4Т4, Т5Т4) и структуры петли (Б) (конструкции Т4Т3, Т4ТТГТТ, Т4ТГТ) в межмолекулярном G-квадруплексе на выход димерной конструкции.

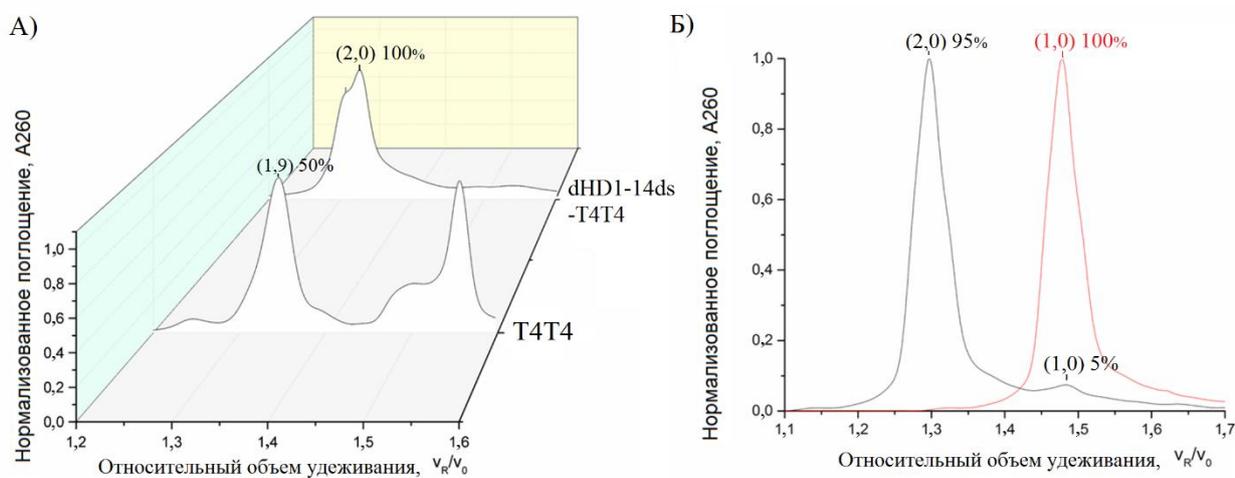


Рисунок 7. Сравнение сборки межмолекулярных конструкций. А: сравнение сборки конструкций с межмолекулярным дуплексом (dHD1-ds-T4T4) и G-квадруплексом (Т4Т4); Б: мономеры HD1-TT-14ss и HD1-TT-c14ss (красная линия) и димерная конструкция dHD1-14ds с межмолекулярным дуплексом (черная линия). Рассчитанные степени олигомеризации указаны в скобках.

ЯМР-спектроскопия димерных конструкций аптамеров к тромбину

Существование димерных конструкций с межмолекулярными замками можно подтвердить спектрами ^1H ЯМР. Спектр ^1H ЯМР 1 mM раствора T4T4, димеризованного за счет межмолекулярного G-квадруплекса содержал набор пиков G-квадруплекса при 11-11,8 м.д. (Рис. 8А). Сигналы ^1H перекрываются, но их расчетное количество составило 16 ядер в полном соответствии с 16 гуанинами в межмолекулярном G-квадруплексе димерной конструкции (Рис. 8А). По данным литературы, пики в диапазоне 11,8-12,3 м.д. соответствуют G-квадруплексу HD1. Таким образом, сравнение полученных спектров со спектрами ЯМР ^1H димеров HD1 и G₃₋₄T₃₋₄G₃₋₄ подтвердило предложенные модели димерной конструкции.

Пики в диапазоне 12,5-14,0 м.д. в спектре ЯМР ^1H раствора димерной конструкции с межмолекулярным дуплексом dHD1-14ds соответствуют дуплексу ДНК, тогда как пики в диапазоне 11,8-12,3 м.д. соответствуют G-квадруплексу HD1 (Рис. 8Б), что подтверждает сосуществование аптамерного модуля и межмолекулярного дуплекса.

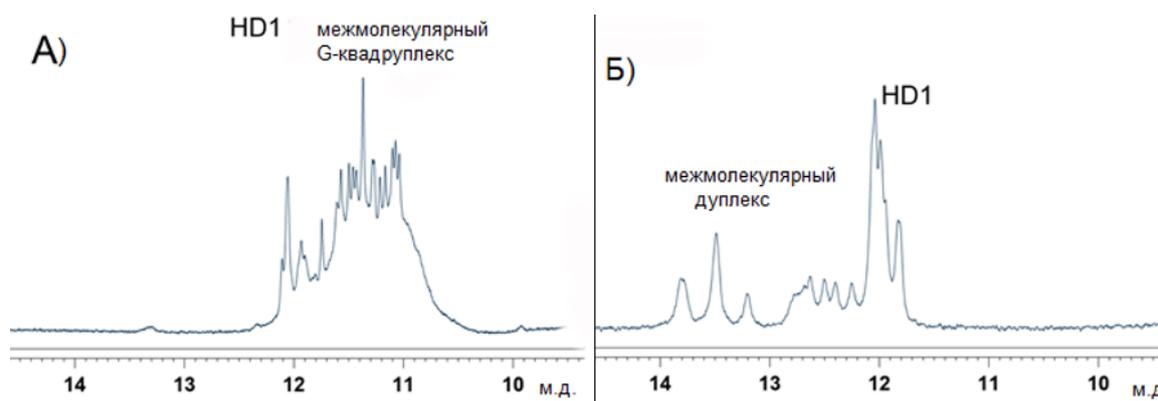


Рисунок 8. Спектры ЯМР ^1H димерных конструкций с межмолекулярным А) G-квадруплексом (1 mM раствор T4T4) и Б) дуплексом (670 мкМ раствор dHD1-14ds).

Топология и термическая стабильность нековалентных димеров аптамеров к тромбину

Спектры кругового дихроизма нековалентных димеров HD1 с межмолекулярным G-квадруплексом имеют характерные пики антипараллельного G-квадруплекса, как и у мономерного аптамера HD1, а именно положительный максимум при 295 нм (Рис 1, Рис. 9). Кривые плавления димерных конструкций T4T4 и dHD1-14ds по данным УФ-спектроскопии имеют зависимое от температуры уменьшение поглощения при 295 нм, что характерно для антипараллельных G-квадруплексов. В отличие от T4T4, кривые плавления dHD1-14ds также содержат зависимое от температуры увеличение поглощения при 260 нм, что характерно для ДНК-дуплексов. На основании данных УФ-спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма были рассчитаны температуры плавления G-квадруплексов.

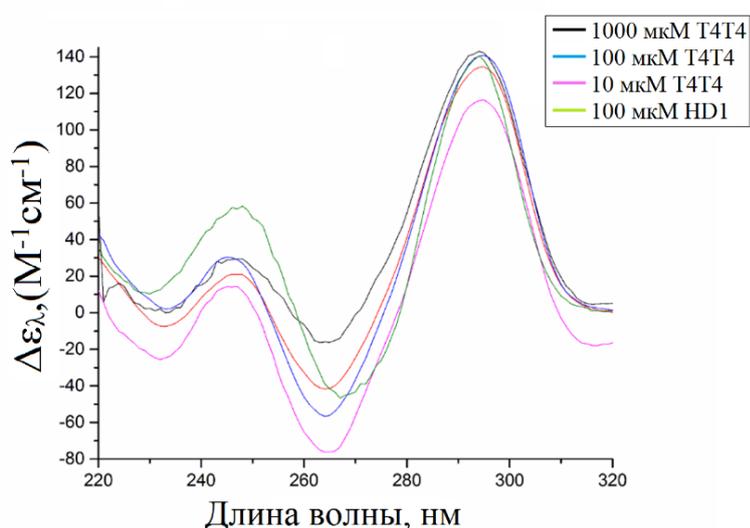


Рисунок 9. Спектры кругового дихроизма мономерного аптамера HD1 и димерной конструкции T4T4 с межмолекулярным G-квадруплексом при разных концентрациях сборки конструкции.

Модуль HD1 в dHD1-14ds имел температуру плавления 33°C, что на 5°C ниже, чем у HD1. При этом

дуплексный модуль денатурирует при нагревании независимо с температурой плавления 62°C. G-квадруплексы T4T4 денатурировали одновременно с температурой плавления (35,6-37,7 °C), что близко к температуре плавления HD1 (38,8 °C).

Ингибирующая активность нековалентных димеров аптамеров к тромбину

Тромбиновое время – коагулометрический тест, который заключается в добавлении тромбина в плазму крови человека. Когда аптамер HD1 связывается с тромбином, свертывание плазмы крови замедляется, увеличивая тромбиновое время. Для изучения ингибирующей активности модулей HD1 димерные конструкции были собраны при концентрации 1000 мкМ (Рис. 10).

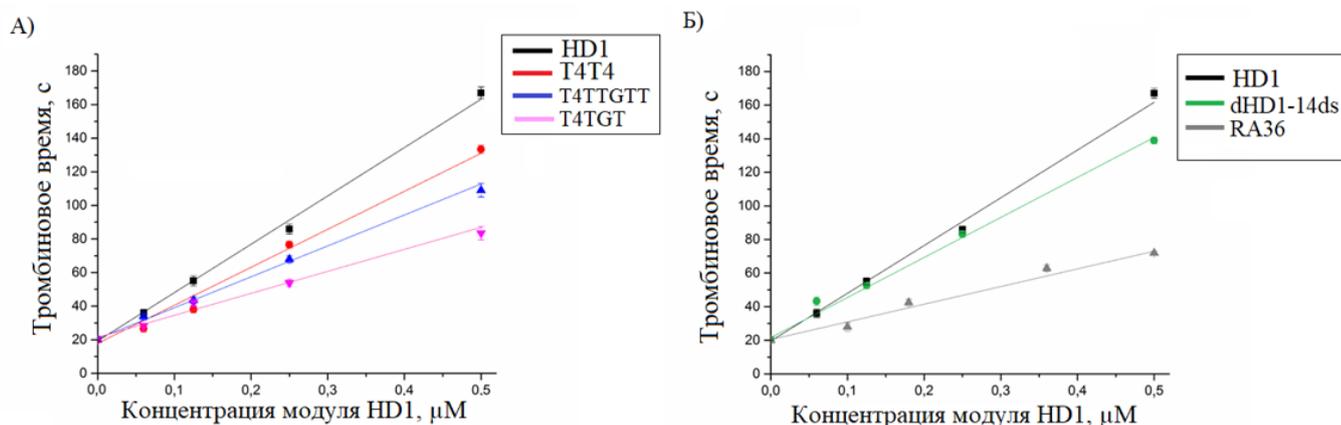


Рисунок 10. Сравнение ингибирующей активности димерных конструкций (А) с межмолекулярным G-квадруплексом – HD1 (черный), T4T4 (красный), T4TTGTT (синий), T4TGT (розовый); (Б) с межмолекулярным дуплексом и ковалентным димером RA-36 – HD1 (черный), dHD1-14ds (зеленый), RA-36 (серый).

Конструкция T4T4 обладала наибольшей ингибирующей активностью среди димерных конструкций с межмолекулярным G-квадруплексом (Рис. 10А). Его активность на 15% уступает

активности аптамера HD1. Аналогичный результат был получен для конструкции dHD1-14ds с межмолекулярным дуплексом (Рис. 10Б). И T4T4, и dHD1-14ds обладали гораздо более высокой ингибирующей активностью, чем ковалентный димер с коротким линкером, аптамер RA-36 (ингибирующая активность RA-36 на 50% меньше активности аптамера HD1). Этот результат указывает на то, что модули HD1 в нековалентных димерах действуют независимо друг от друга, тогда как два модуля в RA-36 действуют как единая структура, а не димер.

Аффинность нековалентных димеров аптамеров к тромбину

Аффинность димерных аптамеров к тромбину оценивали с помощью метода интерферометрии биослоев, который позволяет определять константы скорости и равновесия комплексов белков с олигонуклеотидами.

Нековалентные димерные конструкции с межмолекулярным G-квадруплексом связывают тромбин с большей аффинностью ($K_D = 0,29-0,62$ нМ), чем димеры с межмолекулярным дуплексом ($K_D = 1,5$ нМ). Мономерный аптамер HD1 имел самое низкое сродство ($K_D = 2,6$ нМ). Димерные аптамеры имели гораздо более низкие скорости диссоциации комплексов с тромбином, чем комплекс HD1-тромбин (Табл. 2), что можно объяснить кооперативным связыванием конструкций с двумя соседними иммобилизованными молекулами тромбина.

Таблица 2. Константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также константы диссоциации (K_D) комплексов тромбина с мономерными и димерными аптамерами.

Аптамер	K_D , нМ	$k_a \cdot 10^{-3}$, $M^{-1} \cdot c^{-1}$	$k_d \cdot 10^3$, c^{-1}	Количество модулей HD1	Тип межмолекулярной конструкции
HD1	$2,6 \pm 0,1$	4160 ± 20	$11,0 \pm 1,0$	1	нет
T12HD1T12	$8,0 \pm 0,3$	250 ± 30	$2,0 \pm 0,2$	1	нет
T4T4	$0,50 \pm 0,05$	340 ± 10	$0,20 \pm 0,03$	2	G-квадруплекс
T4TTGTT	$0,30 \pm 0,01$	260 ± 7	$0,20 \pm 0,01$	2	G-квадруплекс
T4TGT	$0,60 \pm 0,04$	470 ± 30	$0,3 \pm 0,1$	2	G-квадруплекс
dHD1-14ds	$1,5 \pm 0,2$	320 ± 8	$0,50 \pm 0,02$	2	дуплекс

II. Димеры аптамеров к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), член семейства ErbB / HER рецепторов трансмембранных тирозинкиназ типа I, вовлечен в многочисленные виды рака. В норме рецепторы ErbB играют важную роль в развитии и росте тканей, изменяя дифференцировку и морфологию клеток. Различные факторы роста, включая фактор роста эпидермиса, служат

лигандами для этого семейства рецепторов. При связывании лиганда происходит гомо- или гетеродимеризация рецепторов.

Димеризация EGFR – один из первых этапов запуска каскада фосфокиназ. В данной работе предлагалось создание димерных аптамеров к EGFR для увеличения аффинности к димерному белку. Для изучения возможности повышения эффективности связывания ДНК- и РНК-аптамеров с мишенью EGFR на клетках было решено получить нековалентные димеры с помощью межмолекулярного дуплекса ДНК-аптамера GR20 (конструкция 1, димер dGR20-20ds, 136 нуклеотидов) и РНК- аптамера к EGFR mE07, (конструкция 2, dmE07-24ds, 148 нуклеотидов). Аптамер U31 предшественник GR20, 76 нуклеотидов Последовательности исследованных ДНК- и РНК- олигонуклеотидов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательности исследованных ДНК- и РНК-олигонуклеотидов.

Олигонуклеотид	Последовательность (5'→3')
U31	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGTTTAAATATGTTTTTTA ATTCCCCTTGTGGTGTGTTGTGGACACGGTGGCTTAGT
GR20	ACGCACCATTTGTTTAAATATGTTTTTTAATTCCCCTTGTGGTGTGT
GR20-TT-20ss	ACGCACCATTTGTTTAAATATGTTTTTTAATTCCCCTTGTGGTGTG TTTCTGGTCATGGCGGGCATTTA
GR20-TT-c20ss	ACGCACCATTTGTTTAAATATGTTTTTTAATTCCCCTTGTGGTGTG TTTTAAATGCCCGCCATGACCAG
mE07	GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGCAUGUCAAAAGCCGGAACCGUCC
mE07-UU-24ss	GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGCAUGUCAAAAGCCGGAACCGUCC UUGAAUUAAAUGCCCGCCAUGACCAG
mE07-UU-c24ss	GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGCAUGUCAAAAGCCGGAACCGUCC UUCUGGUCAUGGCGGGCAUUUAAUUC
20ss	CTGGTCATGGCGGGCATTTA
c20ss	TAAATGCCCGCCATGACCAG
24ss	GAATTAATGCCCGCCATGACCAG
c24ss	CTGGTCATGGCGGGCATTTAATTC

Конструкция 1. Для димеризации с помощью дуплексов, были использованы два ДНК-аптамера GR20, которые имеют на 3'-конце дополнительные участки, которые комплементарны друг другу. Дополнительные участки имели длину 20 нуклеотидов, присоединённых к аптамерному модулю посредством линкера из двух тиминов (Табл. 3). На 5'-конце одного из аптамеров (GR20-TT-20ss) при синтезе была введена флуоресцентная метка на основе

флуоресцеина (ФАМ). На втором аптамере (GR20-ТТ-с20ss) флуоресцентная метка отсутствовала. При смешивании и отжиге первого аптамера (GR20-ТТ-20ss) со вторым (GR20-ТТ-с20ss) дополнительные участки из 20 нуклеотидов гибридизуются с образованием димерного аптамера (dGR20-20ds) (Рис. 1В).

Конструкция 2. Синтезированы два РНК-аптамера mE07, которые имеют на 3'-конце дополнительные участки, которые взаимодоплементарны. Дополнительные участки имели длину 24 нуклеотида. Линкер между аптамерным модулем и дополнительными участками состоял из двух урацилов. На 5'-конце первого аптамера (mE07-UU-24ss) при синтезе была введена флуоресцентная метка на основе флуоресцеина (ФАМ). На втором аптамере (mE07-UU-с24ss) флуоресцентная метка отсутствовала. При смешивании и отжиге первого аптамера (mE07-UU-24ss) со вторым (mE07-UU-с24ss) дополнительные участки из 24-х нуклеотидов гибридизуются с образованием димерного аптамера (dmE07-24ds).

Оценка стабильности межмолекулярных дуплексов

Межмолекулярные дуплексы из 20-ти и 24-х пар оснований (20-ss+20-css и 24-ss+24-css) собирали при концентрации 2 мкМ в буфере 20 мМ Трис·НСl pH 7,0, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂. По данным УФ-спектрометрии температура плавления дуплекса из 20-ти пар оснований составляет 62°C, а дуплекса из 24-ти пар оснований 75°C.

Оценка эффективности сборки димерной конструкции

Выход димера оценивали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Конструкции 1 и 2 собирали при концентрации 2 мкМ в буфере 20 мМ Трис·НСl pH 7,0, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂. Сформирована конструкция мономерного РНК-аптамера mE07 с дуплексом из 24 п.о. на 5'-конце. Комплементарный олигонуклеотид имел в 3'-конце флуоресцентную метку ФАМ.

При смешивании и отжиге аптамера (mE07-UU-24ss) с комплементарной последовательностью (с-24ss) дополнительные участки из 24-х нуклеотидов гибридизуются с образованием дуплекса (mE07-24ds). По данным эксклюзионной хроматографии как конструкция 1 (Рис. 11А), так и конструкция 2 (Рис. 11Б) собираются преимущественно в димерной форме.

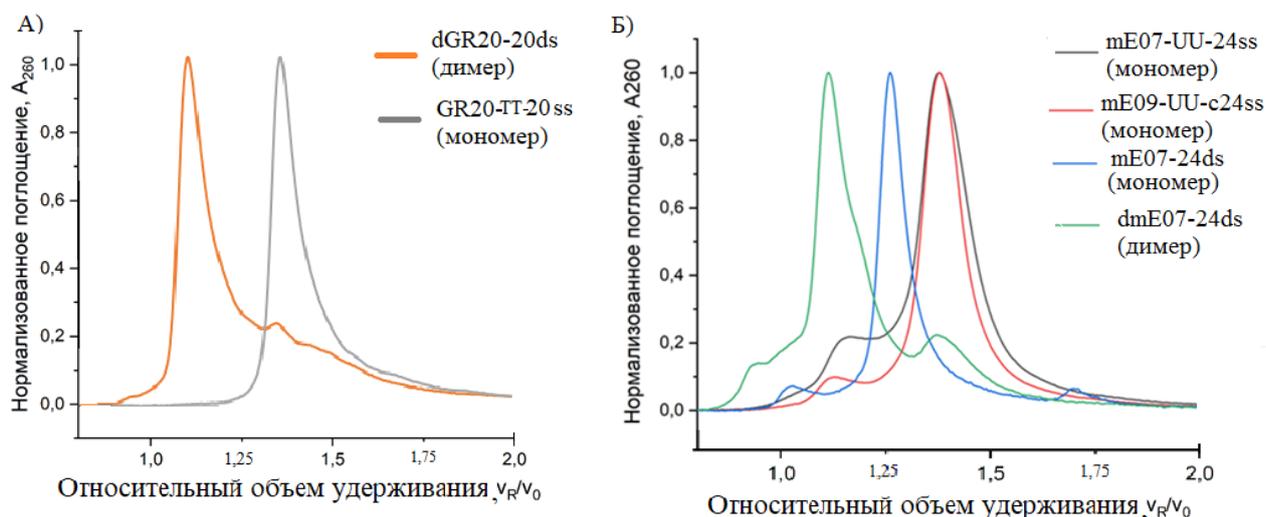


Рисунок 11. Оценка выхода конструкций ДНК- (А) и РНК- (Б) аптамеров к EGFR. А: Серая линия – мономерный GR20-TT-20ss, оранжевая линия – dGR20-20ds – димерный аптамер с межмолекулярным дуплексом. Б: Серая линия – mE07-UU-24ss – мономер аптамера с одноцепочным (оц.) РНК- «хвостом», красная линия – mE09-UU-c24ss – мономер аптамера с оц. РНК- комплементарным «хвостом», синяя линия mE07-24ds- мономер аптамера с дуплексным «замком», зеленая линия - dmE07-24ds димер аптамера с дуплексным «замком».

Связывание мономерных и димерных аптамеров к EGFR с клетками линии A431

По данным базы <https://www.proteinatlas.org/> A431 – это клеточная линия с самым высоким уровнем экспрессии мРНК EGFR..

С помощью проточной цитофлуорометрии изучено связывание димеров ДНК- и РНК- аптамеров к EGFR с клетками линии A431 (Рис. 12).

Концентрация аптамеров при инкубации с клетками линии A431 составляла 2 мкМ. В данных условиях мономерный ДНК-аптамер GR20 и димерный ДНК-аптамер dGR20-20ds одинаково эффективно взаимодействуют с клетками (Рис. 12А).

Аналогичный опыт с РНК-аптамерами показал, что наибольшим сродством к клеткам линии A431 обладает исходный аптамер mE07 (Рис. 12Б,В). Сродство димера аптамера dmE07-24ds к клеткам линии A431 уменьшилось на 30% относительно исходного аптамера mE07.

Таким образом, предложенные димерные конструкции сохраняют сродство к клеткам линии A431. В сравнении с мономерными аптамерами, сродство димерной конструкции dGR20-20ds не изменено, а сродство димерной конструкции dmE07-24ds снижено на 30%.

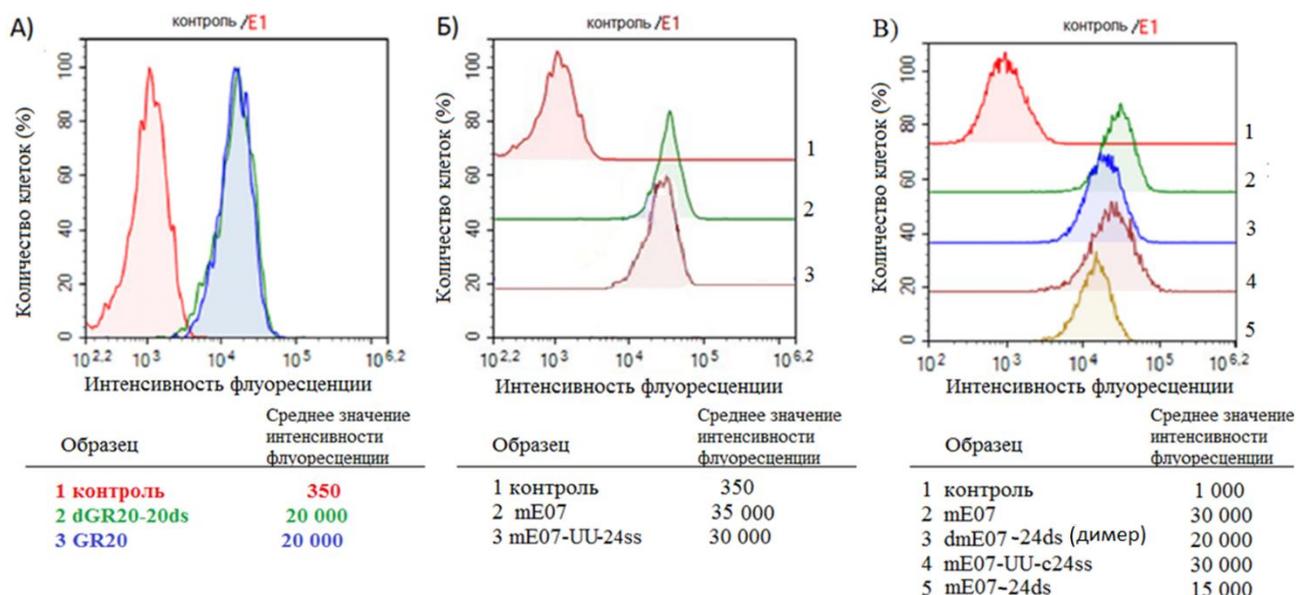


Рисунок 12. Клетки линии A431, флуоресцентно меченные (А) ДНК- и (Б,В) РНК-аптамерами по данным проточной цитофлуориметрии. А: Исходные клетки – красным цветом, клетки после взаимодействия с мономерным ДНК-аптамером GR20 – синим, клетки после взаимодействия с димерной конструкцией dGR20-20ds – зеленым; Б: исходные клетки – красным цветом(1); клетки после взаимодействия с мономерным РНК-аптамером mE07 – зеленым(2), клетки после взаимодействия с мономерным РНК-аптамером с дополнительной последовательностью mE07-UU-24ss – коричневым(3). В: исходные клетки – красным цветом(1), клетки после взаимодействия с мономерным РНК-аптамером mE07 – зеленым(2), клетки после взаимодействия с димерной конструкцией dmE07-24ds – синим(3), клетки после взаимодействия с мономерным РНК-аптамером с дополнительной последовательностью mE07-UU-c24ss – коричневым(4), клетки после взаимодействия с мономерным РНК-аптамером с дополнительным дуплексом mE07-24ds – желтым(5).

Локализация димерных конструкций dGR20-20ds и dmE07-24ds в клетках линии A431

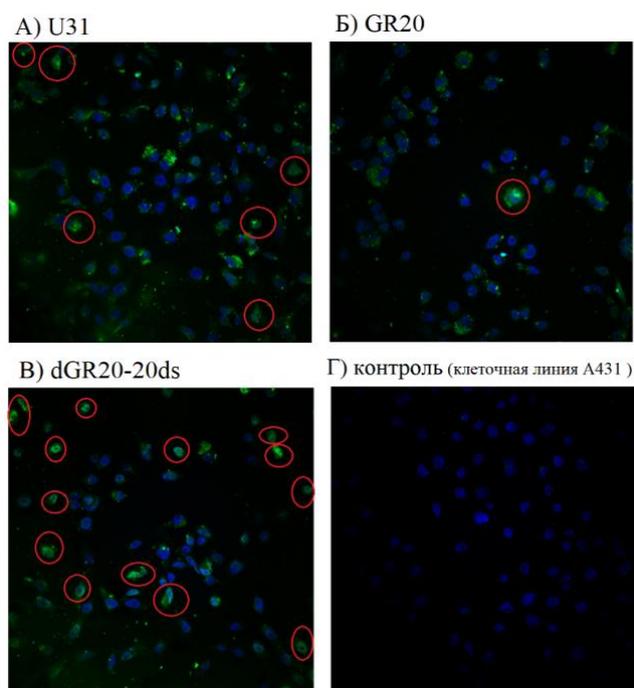
Локализацию аптамеров исследовали методом конфокальной микроскопии. 5'-ФАМ-меченные аптамеры U31, GR20 и dGR20-20ds инкубировали с клетками линии A431 3 часа при 37°C. Ядра клеток окрашивали раствором бисбензида.

По данным конфокальной микроскопии димерная конструкция dGR20-20ds частично локализована в ядрах клеток линии A431. Для мономерных аптамеров U31 и GR20 локализация в ядрах клеток была значительно менее выражена (Рис. 13).

При взаимодействии аптамеров с клеточной линией A431 ДНК-аптамеры наблюдаются как в цитоплазме, так и в ядрах клеток. Проникновение димера ДНК-аптамера GR20 происходит

эффективнее, чем у мономера (димер аптамера GR20: 13-15 локализаций аптамера в ядре, мономер GR20 1-2) (Рис. 13Б,В).

В настоящее время существуют данные, о том, что меченный EGF может перемещается вместе с рецептором в ядро (De Angelis Campos et al. 2011). Исходя из этих данных можно предположить, что димерные аптамеры узнают рецептор (вероятно, в димерной форме) и интернализируются в ядро. Димер РНК-аптамера (dmE07-24ds) и исходный РНК-аптамер mE07 не проникают в ядра клеток линии A431 (Рис. 14). Таким образом, этот эффект зависит от сайта связывания аптамера на поверхности EGFR.



связывания аптамера на поверхности EGFR.

Рисунок 13. Конфокальная микроскопия клеток линии A431, обработанных FAM-мечеными аптамерами: U31 (А), GR20 (Б), dGR20-20ds (В); клетки без олигонуклеотидов (Г). Синий цвет – ядра клеток A431, окрашенные бисбензими́дом. Зеленый цвет – локализация аптамеров с FAM-меткой.

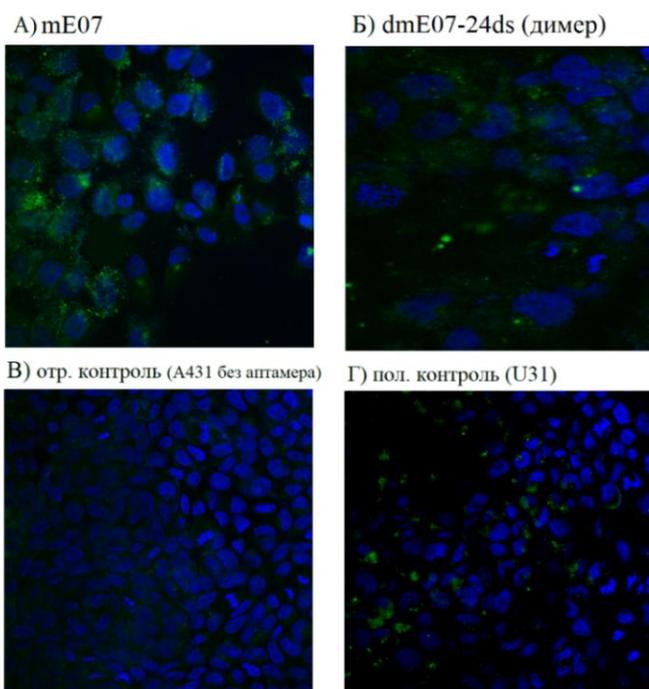


Рисунок 14. Конфокальная микроскопия клеток линии A431, обработанные FAM-мечеными мономерным РНК-аптамером mE07 (А), димерной конструкцией dmE07-24ds (Б). Контроли: клетки, не обработанные аптамерами (В), и клетки, обработанные ДНК-аптамером U31 (Г). Синий цвет – ядра клеток, окрашенные бисбензими́дом. Зеленый цвет – локализация аптамеров с FAM-меткой.

Определение выживаемости клеток линии A431 при действии ДНК- аптамеров

С помощью теста для оценки метаболической активности клеток (МТС) была изучена выживаемость клеток линии A431 после трехдневной инкубации с ДНК-аптамерами U31, GR20 или GR20-20ds в концентрациях 10 мкМ (U31, GR20) и 5 мкМ (GR20-20ds). Все аптамеры снижают выживаемость клеток. Выживаемость клеток выше в присутствии исходных аптамеров U31 и GR20 по сравнению с димером GR20-20ds: у мономерного GR20 – 92%, у U31 – 84%, а у димера – 73% (Табл. 4). Антипролиферативный или цитотоксический эффект димерной конструкции аптамера более выражен, чем у мономерных аптамеров U31 и GR20.

Таблица 4. Влияние аптамеров на выживаемость клеток линии A431. В скобках указаны концентрации аптамеров в эксперименте. Приведены относительные значения, нормированные на контроль, полученные в МТС-тесте. Контроль – 100%

Аптамер	Выживаемость, %
Контроль	100 ± 5
U31 (10 мкМ)	84 ± 4
GR20 (10 мкМ)	92 ± 1
dGR20-20ds(5 мкМ)	73 ± 4

Заключение

В данной работе аптамер к тромбину HD1 был использован в качестве модельного объекта для создания димерных конструкций за счет нековалентной сборки. Посредством олигонуклеотидного линкера аптамер был соединен с гуанин-богатой последовательностью, способной образовать межмолекулярный димер за счет образования антипараллельного G-квадруплекса, т.е. с помощью G-квадруплексного «замка». С помощью комплементарного олигонуклеотида аптамеры были димеризованы с образованием межмолекулярного дуплекса, т.е. с помощью дуплексного «замка» (Рис. 1). Для оценки выхода целевых соединений нами была разработана новая методика эксклюзионной ВЭЖХ, которая позволяет оценить молекулярную массу G-квадруплексов и степень олигомеризации (число олигонуклеотидов) конструкций, используя калибровку, полученную при анализе набора дуплексов ДНК известной длины. Аптамера (T4T4) с межмолекулярным G-квадруплексом образует димер. При концентрации 1000 мкМ выход димеров достигал 50% (Рис. 5). На определяемый выход конструкций влияет состав подвижной фазы при разделении олигомеров, а также состав буфера, в котором была проведена сборка конструкции (Рис. 3, 4).

Было исследовано влияние последовательности линкера и петли в межмолекулярном G-квадруплексном «замке». Выход димерной конструкции увеличивался при уменьшении длины

линкера до 3 нуклеотидов (ТТТ) и при введении гуанина в состав латеральной петли G-квадруплекса, например, TTGTT и TGT. Петли TGT и TTGTT увеличивают выход димера на 20% (Рис. 6). Увеличение длины линкера незначительно влияет на сборку димера с межмолекулярным G-квадруплексным замком, а укорочение длины линкера увеличило выход димера на 10% по данным ВЭЖХ (Рис. 6).

Спектроскопию кругового дихроизма, УФ-спектроскопию и ^1H ЯМР, подтвердили сосуществование G-квадруплекса аптамерного модуля и межмолекулярного G-квадруплекса в конструкции T4T4. Подтверждено сосуществование G-квадруплекса аптамерного модуля и межмолекулярного дуплекса в конструкции dHD1-14ds.

В тесте тромбинового времени ингибирующая активность модулей HD1 в димерных конструкциях была аналогична эффективности одного HD1 в большинстве предложенных димерных конструкций. При этом наблюдались 2-10-кратные различия в аффинности к иммобилизованному тромбину. Димерные конструкции с межмолекулярным G-квадруплексом связывают тромбин с более высоким сродством ($K_d = 0,29-0,62$ нМ), чем димерные конструкции с межмолекулярным дуплексом dHD1-14ds ($K_d = 1,5$ нМ).

Мономерные ДНК- и РНК-аптамеры к EGFR (GR20, mE07) были димеризованы с помощью дуплексного «замка» для увеличения сродства к димерной форме EGFR.

Методом УФ-плавления показано, что межмолекулярные дуплексы стабильны при физиологических условиях. Конструкции собираются с высоким выходом (80% димерной конструкции, Рис. 11).

При сравнении аффинности димерной конструкции dGR20-20ds с мономерными аптамерами U31 и GR20 с помощью проточной цитофлуориметрии показано, что сродство к клеткам линии A431 сохраняется (Рис. 12).

Локализация ФАМ-меченных аптамеров в клеточной линии A431 изучали с помощью конфокальной микроскопии. При связывании ДНК-аптамеров к EGFR с клеточной линией A431 аптамеры наблюдаются в ядрах.

Димерная конструкция на основе РНК-аптамера к EGFR, dmE07-24ds, обладает меньшим сродством к клеткам линии A431, чем мономерный аптамер mE07 (Рис. 12), и не наблюдаются в ядрах клеток A431 (Рис. 14).

ВЫВОДЫ

1. Получены димерные конструкции на основе 15-звенного G-квадруплексного ДНК-аптамера к тромбину HD1 за счет образования межмолекулярных G-квадруплексов и дуплексов, а также на основе ДНК- и РНК-аптамеров к рецептору эпидермального фактора роста, EGFR, за счет образования межмолекулярных дуплексов длиной 20–24 п.о.
2. Нековалентные димеры аптамеров на основе HD1 сохраняют структуру модулей и ингибирующую активность.
3. По данным эксклюзионной ВЭЖХ выход димеров аптамеров с межмолекулярным дуплексом выше, чем у димеров аптамеров с межмолекулярным G-квадруплексом. Прочность комплекса тромбина с димерами аптамеров с межмолекулярным G-квадруплексом существенно выше, чем с димерами аптамеров с межмолекулярным дуплексом.
4. По данным проточной цитофлуорометрии сродство к клеткам линии A431 сопоставимо для мономерного (GR20) и димерного (dGR20-20ds) ДНК-аптамеров к EGFR. По данным конфокальной микроскопии димерная конструкция на основе ДНК-аптамера к EGFR интернализуется в ядра клеток линии A431.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2 по специальности 1.4.9— биоорганическая химия (химические науки):

1. **Alieva R.**, Zavyalova E., Tashlitsky V., Kopylov A. // Quantitative characterization of oligomeric state of G-quadruplex antithrombin aptamers by size exclusion HPLC // *Mendeleev Communications*. 2019. Vol 29. P. 424-425. IF = 1,77 (Web of Science)
2. Zavyalova E., Legatova V., **Alieva R.**, Zalevsky A., Tashlitsky V., Arutyunyan A., Kopylov A. // Putative mechanisms underlying high inhibitory activities of bimodular DNA aptamers to thrombin // *Biomolecules*. 2019. Vol 9(2). P 41. IF = 4,927 (Web of Science)
3. **Alieva R.**, Tashlitsky, V., Arutyunyan, A., Kopylov A., Zavyalova, E. // Bimodular thrombin aptamers with two types of non-covalent locks // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 2021. Vol 40(5). P 559-577. IF = 1,167 (Web of Science)

Иные публикации в рецензируемых научных изданиях:

1. **Алиева Р. Ш.**, Завьялова Е. Г., Копылов А. М. // Исследование связывания ДНК-аптамеров к EGFR с различными раковыми клетками, экспрессирующими EGFR, интерферометрическим методом // *Химия биологически активных веществ ХимБоАктив-2019*. — Саратов: Саратов, 2019. — С. 264.
2. **Алиева Р. Ш.** // Исследование связывания ДНК-аптамеров к EGFR с различными раковыми клетками, экспрессирующими EGFR, интерферометрическим методом. // *Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019»*. — Москва: Россия, 2019. — С. 1.