

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., профессор, Копылов А.М.

к.х.н. Завьялова Е.Г.

Москва

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность проблемы	7
Степень разработанности темы	8
Цели и задачи исследования.....	9
Объект исследования	9
Предмет исследования.....	10
Научная новизна исследования	10
Теоретическая значимость исследования	10
Практическая значимость исследования	10
Методология диссертационного исследования	11
Основные положения, выносимые на защиту	12
Степень достоверности результатов	12
Апробация работы.....	12
Публикации	13
Личный вклад автора	13
Структура и объём диссертации.....	14
ГЛАВА 1. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	14
1.1. Аптамеры: определение, структуры, мишени	14
1.2. Димеры аптамеров: общие принципы	16
1.3. G-квадруплекс-содержащие аптамеры к тромбину	20
1.3. Димеры аптамеров к тромбину	24

1.4.1. Ковалентные димеры аптамеров к тромбину	24
1.4.2. Нековалентные димеры аптамеров к тромбину	27
1.5. EGFR как маркер опухолевых клеток.....	31
1.6. Аптамеры к EGFR.....	32
1.7. Димеры аптамеров к EGFR	35
ГЛАВА 2. НЕКОВАЛЕНТНЫЕ ДИМЕРЫ АПТАМЕРОВ К ТРОМБИНУ И РЕЦЕПТОРУ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ).....	42
2.1. Димеры аптамеров к тромбину	43
2.1.1. Количественная оценка выхода димерных наноконструкций.....	43
2.1.1.1. Электрофорез в полиакриламидном геле.....	43
2.1.1.2. Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография.....	45
2.1.1.2.1. Оценка степени олигомеризации нековалентного димера G-квадруплексного аптамера к тромбину (Т4Т4).	49
2.1.1.2.2. Оптимизация условий эксклюзионной хроматографии.	51
2.1.1.2.3. Димерные конструкции с межмолекулярным дуплексом	54
2.1.1.2.4. Оптимизация сборки конструкций при нековалентной димеризации.....	55
2.1.2. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.....	57
2.1.3. Оценка топологии G-квадруплексов и термической стабильности димерных конструкций.....	59
2.1.4. Оценка функциональной активности димерных аптамеров к тромбину.....	62
2.1.5. Оценка аффинности димерных аптамеров к тромбину	63
2.2. Димеры аптамеров к EGFR	65
2.2.1. Оценка термической стабильности межмолекулярных дуплексов.....	66

2.2.2. Оценка сборки димерной конструкции	67
2.2.3. Связывание мономерных и димерных аптамеров к EGFR с клетками линии A431	68
2.2.4. Локализация аптамеров к EGFR в клетках линии A431	71
2.2.5. Исследование выживаемости клеток линии A431 в присутствии ДНК-аптамеров.....	76
Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	77
3.1. Реактивы и биопрепараты	77
3.1.1. ДНК-олигонуклеотиды.....	78
3.1.2. РНК- олигонуклеотиды	80
3.1.3. Растворы для сборки конформации аптамеров	80
3.2. Методы	81
3.2.1. Эксклюзионная хроматография	81
3.2.2. Электрофорез в полиакриламидном геле	83
3.2.3. Спектроскопия кругового дихроизма и УФ-спектроскопия	84
3.2.4. Спектроскопия ЯМР ¹ H.....	85
3.2.5. Интерферометрия биослоев	86
3.2.6. Культивирование линии клеток A431	89
3.2.7. Конфокальная микроскопия.....	89
3.2.8. Проточная цитофлуориметрия	91
Заключение.....	92
Список литературы	95

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В диссертационной работе использованы обозначения структурных компонентов нуклеиновых кислот в соответствии с рекомендациями Межведомственного комитета по терминологии, номенклатуре и символике Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC), а также следующие обозначения:

A431	Клеточная линия эпидермальной карциномы
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГБМ	Глиобластома
ГФ	Гель фильтрация
ГЭГ	Гексаэтиленгликоль
КД	Круговой дихроизм
K_d , K_D	Константа диссоциации
НМРЛ	Немелкоклеточный рак легкого
о.е.	Оптические единицы
о.ц.	Одноцепочечное
п.о.	Пары оснований
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПФ	Подвижная фаза
ПЭГ	Полиэтиленгликоля
ССМК	Сульфо-N-сукцинимидил-4-(maleidometil) циклогексан-1-карбоксилат
ТЕМЕД	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамид
ТЭГ	Триэтиленгликоль
$T_{пл}$	Температура плавления
DTI	Direct thrombin inhibitors, прямые ингибиторы тромбина
EGFR	Epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста

EGFR _{wt}	Epidermal growth factor receptor wild-type, рецептор EGFR дикого типа
EGFR _{vIII}	Epidermal growth factor receptor with mutant variant III, Рецептор EGFR с мутацией вариант III
FACS	Fluorescence-activated single cell sorting, Проточный сортирующий цитофлуориметр
FAM, ФАМ	Флуоресцеин
HGF	Фактора роста гепатоцитов
G- квадруплекс, GQ	Гуаниновый квадруплекс
mAb	Monoclonal antibody, моноклональное антитело
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, систематическая эволюция лигандов с экспоненциальным обогащением
PBS	Раствор фосфатного буфера
PDGF	Фактор роста тромбоцитов
TBA, ТБА	Thrombin-binding aptamer тромбин-связывающий аптамер
TKI	Tyrosine kinase inhibitor, ингибиторы тирозинкиназы
VEGF	Vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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-квадруплексом или дуплексом. 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.

ГЛАВА 1. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Аптамеры: определение, структуры, мишени

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот представляют собой короткие фрагменты ДНК или РНК, которые, имея специфическую трехмерную структуру, могут связываться с высокой аффинностью и специфичностью с мишенью. Константы диссоциации (K_d) комплексов аптамер-мишень находятся в диапазоне от нескольких пикомоль/л до микромоль/л в зависимости от мишени [1-6]. Мишенями для аптамеров могут быть белки, неорганические ионы, органические соединения, вирусы и целые клетки [7-8]. Благодаря стабильности, простоте синтеза и модификации широким спектром функциональных групп, аптамеры используются в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и биомедицины. Аптамеры имеют ряд диагностических и терапевтических применений, таких как биосенсоры и ингибиторы сигнальных путей.

Аптамеры получают из искусственно созданных комбинаторных библиотек олигонуклеотидов. Процедура отбора называется SELEX – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения. Отбор определяется высоким сродством аптамера к мишени, т.е. в результате выделяют наиболее стабильные комплексы

олигонуклеотидов с мишенью, полученные в результате конкурентного связывания всех возможных олигонуклеотидов. Процедуру отбора повторяют несколько раз, увеличивая фракцию высокоаффинных олигонуклеотидов.

Поскольку аптамеры – фрагменты нуклеиновых кислот, они обладают уникальными свойствами. Например, у аптамеров есть антитоды: комплементарные олигонуклеотиды, разрушающие уникальную пространственную структуру аптамера, образуя двойную спираль.

Связывание мишени происходит за счет нековалентных взаимодействий: электростатических, водородных связей и гидрофобного эффекта. Аптамеры можно модифицировать химически, улучшая фармакокинетические и фармакодинамические свойства [7,8]. Более того, модификации могут значительно повысить сродство к мишени [9,10]. В частности, известны подходы по замене природных сахаров и азотистых оснований модифицированными вариантами [11–21] и изменению фосфодиэфирной связи [22–31].

Несколько аптамеров имеют структуру G-квадруплексов (GQ) (Рис.1) [32]. G-квадруплексы состоят из G-тетрад, образованных четырьмя гуанинами, соединенных друг с другом восемью водородными связями и стабилизированных такими катионами, как K^+ [33] или Na^+ [34]. Две или более G-тетрады накладываются друг на друга, образуя G-квадруплекс [34,35]. Для соединения блоков гуанинов используются соединяющие петли трех типов: пропеллерные, латеральные и диагональные [36]. В зависимости от ориентации 5'-концов блоков гуанинов можно выделить три топологии G-квадруплексов: антипараллельные (две пары противоположно ориентированных цепей) (Рис. 1.1 и 1.2), гибридные (три цепи имеют одинаковую ориентацию, а одна цепь противонаправлена) (Рис. 1.3) и параллельные (все цепи имеют одинаковую ориентацию) (Рис. 1.4) [10,12]. Кроме того, по количеству цепей G-квадруплексы можно разделить на

внутримолекулярные (образованные одной цепью) и межмолекулярные (несколько цепей) [35].

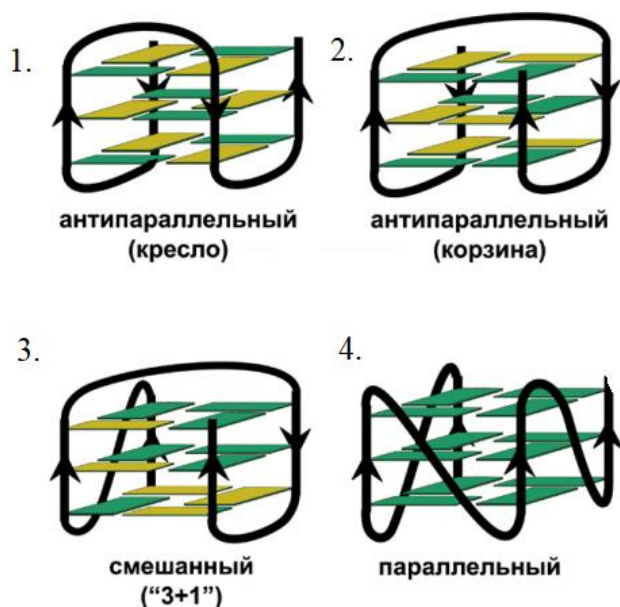


Рисунок 1. Схематическое изображение внутримолекулярных GQ разной топологии; желтым цветом обозначены гуанозины в син-конформации, зеленым цветом – в анти-конформации.

1.2. Димеры аптамеров: общие принципы

Белки могут иметь более одного потенциального сайта связывания аптамерами, например, быть димерными, тетрамерными или мультимерными, либо мультимеризоваться в силу физиологических или патологических причин. Поэтому особый интерес представляют конструкции мультимерных аптамеров, особенно в простых димерных формах [38-41]. Мультимерные аптамеры являются привлекательными как для терапевтических [2,42-47], так и для диагностических [48-53] целей. Эти конструкции аптамеров можно использовать для увеличения

степени димеризации белковых рецепторов, ингибирования димеров белков и для исследования расстояния между белками в комплексе.

Способ соединения определяет особенности взаимодействия аптамер-мишень и функции мультиаптамерной конструкции [54,55]. Увеличение сродства, наблюдаемое для двух- или поливалентных взаимодействий, может быть результатом комбинации разных механизмов, включая хелатирование, перекрестное связывание, статистическое повторное связывание и стерическое экранирование [54,55] (Рис. 2).

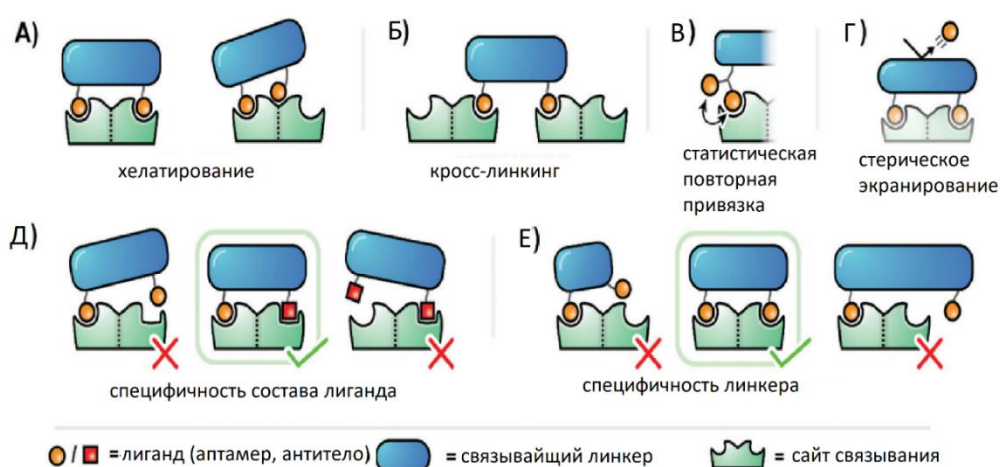


Рисунок 2. Дву- или мультимерные взаимодействия аптамеров – мишеней (лиганд-рецепторов) могут приводить к значительному увеличению аффинности (А – Г) или специфичности (Д и Е). (А) Хелатирование – модули взаимодействуют либо с двумя одинаковыми сайтами связывания (слева), либо с разными сайтами связывания на одной мишени (справа). (Б) кросс-линкинг объединяет одинаковые участки связывания на двух разных мишенях. (В) Статистическое повторное связывание включает быстрый обмен локально сгруппированных модулей. (Г) Стерическое экранирование большим каркасом может препятствовать подходу конкурирующих моновалентных аптамеров. Поливалентные связывающие агенты должны иметь модули правильной структуры (Д) и пространственного расположения (Е), чтобы произошло узнавание [56].

Эффект хелатирования относится к связыванию соседних сайтов (Рис. 2А), когда кластер поливалентных лигандов первоначально связывается одним лигандом с рецепторным сайтом, и каркас, соединяющий лиганды, размещает второй лиганд вблизи второго рецепторного сайта.

При эффективном подборе расстояния между рецепторными сайтами увеличивается аффинность. В случае гибкого линкера вместо каркаса могут потребоваться дополнительные энтропийные затраты для достижения необходимого расположения модулей. В результате жесткие каркасы, обычно обеспечивают более высокую аффинность. Другие типы взаимодействия могут возникать, когда мультимерный лиганд соединяет несколько одинаковых или разных рецепторов (Рис. 2Б). Аффинность и функциональная активность конструкции определяются подбором как лиганда, так и каркаса.

Конструкции, которые сайта позволяют восстанавливать комплекс, как только один из лигандов диссоциирует (Рис. 2В). Этот механизм приводит к более медленной диссоциации комплекса, что дополнительно увеличивает аффинность. Стерическое экранирование способствует усилению комплексообразования, когда поливалентный лиганд достаточно велик, чтобы препятствовать приближению конкурирующих лигандов (Рис. 2Г). Мультимерные конструкции также могут повышать специфичность связывания (Рис. 2Д), например, за счет соединения двух разных модулей. Геометрическая структура поливалентного рецептора также определяет специфичность связывания (Рис. 2Е). ориентируют несколько лигандов в непосредственной близости друг от друга - например, кластеры гликанов - обладают эффектом повторного связывания, при котором несколько лигандов вокруг одного рецепторного

Следовательно, геометрия и жесткость каркаса, соединяющего модули, имеют решающее значение для обеспечения правильного

расположения модулей в трехмерной структуре, соответствующей целевой мишени.

Аптамерные модули могут быть ковалентно соединены и этот подход довольно часто используется [41,57-63]. Наиболее очевидный подход основан на использовании олигонуклеотидных линкеров. Изменяя длину и последовательность такого линкера, можно контролировать расстояние между отдельными аптамерами и влиять на их связывание с мишенью. Если каждая аптамерная единица предназначена для независимой работы, используются линкеры «нейтрального» типа, такие как олиго (A), олиго (U) или олиго (T) [57, 57-63].

«Нейтральные» линкеры имеют размеры от 3 до 50 нуклеотидов [61,64], и наиболее часто используется длина 15–20 нуклеотидов. Более надежный, но и более трудоемкий подход к созданию линкера требует дополнительного SELEX [65,66]. Этот т. н. «химерный» SELEX использует различные комбинации аптамерных модулей с рандомизованным линкером. После нескольких раундов отбора популяция обогащается молекулами, которые сохраняют связывающую активность всех модулей в мультимерных конструкциях. Эта стратегия была разработана для конструирования бинарных (димерных) аптамеров, но, в принципе, ее можно использовать для получения более сложных мультимерных молекул с разным сродством. Для связывания мультимерных аптамеров с многовариантными мишенями (например, мультимерными белками или белками, экспрессируемыми при высокой плотности на поверхности клетки) можно использовать avidность. Термин аффинность описывает взаимодействие между одним модулем аптамера и его сайтом связывания с K_d , а avidность, объединяет множественные взаимодействия и описывает интегральный комплекс аптамер-мишень. Avidность может значительно превышать индивидуальное сродство аптамеров. Однако для достижения заметного эффекта avidности для мультимерных аптамеров требуется продуманный дизайн мультимерной конструкции.

В мультимерных РНК-аптамерах к фактору теплового шока HSF1 [67,68], оптимизация длины и гибкости связей между модулями аптамера привела к 100-кратному увеличению аффинности. Использование сложных линкеров возможно для конструкций на основе ДНК и сохраняет активность отдельных аптамеров, даже когда они слиты в жесткую, циклическую молекулу ДНК [69,70].

Можно использовать линкеры ненуклеотидной природы. Линкеры из полиэтиленгликоля (ПЭГ) состоят из остатков гексаэтиленгликоля ($-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6-$; линкеры этого типа можно рассматривать как полностью нейтральные, как аналоги олигонуклеотидных линкеров. 8-10 остатков гексаэтиленгликоля используются для обеспечения высокой аффинности [53,71,72] даже с белками на поверхности клеток [73].

Мультимеры, содержащие большое количество модулей аптамеров, получают путем ковалентной пришивки отдельных аптамеров к поверхности наночастиц Au [74,75] или Ag [76] или к наружной поверхности вируса [77,78], что значительно увеличивает аффинность к мишени.

Сборка аптамерных конструкций путем соединения аптамеров с помощью различных структурных модулей является интересным подходом, который может обеспечить улучшение сродства аптамеров к мишеням, поливалентность связывания [71] или изменение фармакодинамических и фармакокинетических свойств [79,80].

1.3. G-квадруплекс-содержащие аптамеры к тромбину

Наиболее известным аптамером на основе G-квадруплекса является тромбин-связывающий аптамер (ТБА, также известный как ТБА15, HD1 и ARC-183). Этот 15-мерный аптамер с последовательностью

GGTTGGTGTGGTTGG был открыт в 1990 г. Он является наиболее охарактеризованным аптамером к тромбину [81,82] (Рис. 3).

Аптамер связывает экзосайт I тромбина, тем самым ингибируя взаимодействие тромбина с фибриногеном и образование фибринового сгустка. Структура HD1 подробно описана [83,84]. Стабилизация G-квадруплекса ионами калия обеспечивает максимальную аффинность к тромбину [85]. В последние годы было предпринято множество попыток модификации аптамера, включая замену природных нуклеозидных фрагментов их аналогами [41–45], модификацию остова [24,46], сахарных фрагментов [20,47–50] и циклизацию [51].

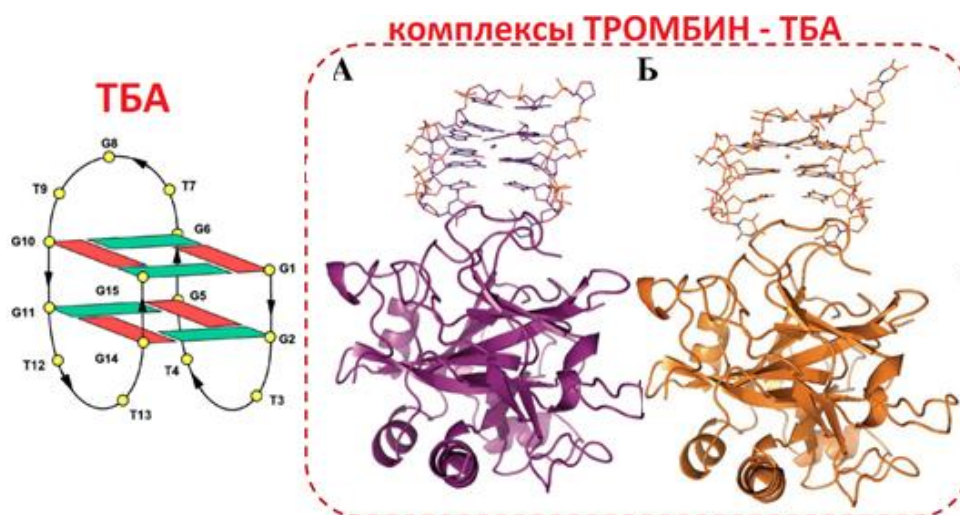


Рисунок 3. Схематическое изображение антипараллельного G-квадруплекса 15-звенного аптамера ТБА к тромбину (слева): 2'-дезоксигуанозины в анти- и син- конформации показаны зеленым и красным цветом, соответственно; и структура комплексов ТБА с тромбином в присутствии ионов натрия (А) или калия (Б) (справа) [83].

Один из вариантов модификации аптамера HD1 – добавление дуплекса, соединяющего концы G-квадруплекса (Рис. 4). Для ДНК-аптамера 31ТБА, с последовательностью СACTGGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCCAGTG, с дуплексным модулем из шести пар оснований и линкерами из 2 нуклеотидов, показано, что GQ модуль аптамера сохраняет внутримолекулярную

антипараллельную топологию, характерную для HD1 (Рис 4А) [34,37]. Константы диссоциации комплекса 31ТБА-тромбин составляют 0,3–0,5 нМ, что в 30 раз ниже, чем у HD1 [86,87].

Добавление дуплексного элемента с одновременным изменением петель G-квадруплекса (Рис. 4Б) может привести к изменению конформации GQ и изменению специфичности аптамера. Аптамер HD22 связывается с экзосайтом II тромбина [88,89]. При этом аффинность к тромбину в 20-50 раз больше, чем у HD1, а антикоагулянтная активность значительно ниже. Снижение антикоагулянтной активности при одновременном повышении аффинности связано с изменением узнаваемого сайта: взаимодействие HD22 с экзосайтом II тромбина не препятствует образованию комплекса тромбин-фибриноген.

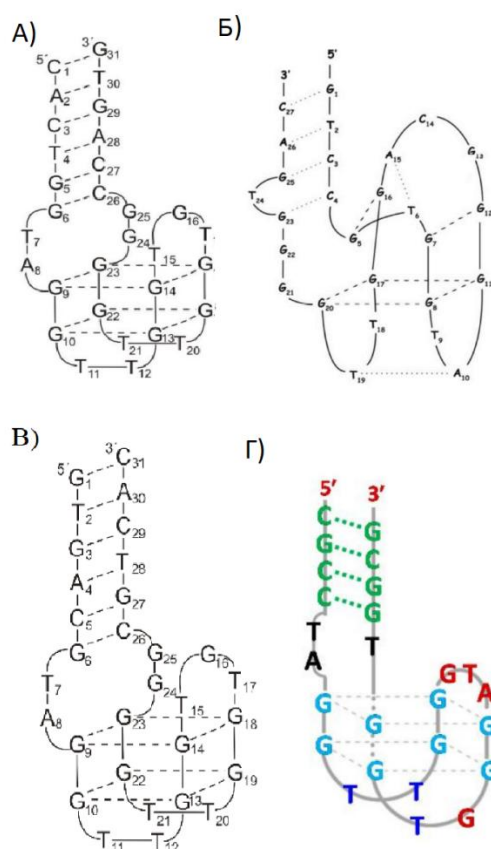


Рисунок 4. G-квадруплекс/дуплексные аптамеры к тромбину. А - 31ТВА; Б - HD22; В - RE31; Г - NU172.

Пространственная структура HD22 содержит псевдо-G-квадруплексный модуль, связанный непосредственно с дуплексным модулем (Рис. 4Б). Примечательно, что оси обоих модулей ориентированы почти перпендикулярно друг другу. Такое расположение способствует оптимальному контакту обоих модулей аптамера с экзосайтом II тромбина.

В 2011 г. Мазуров и соавт. открыли новый аптамер к тромбину, названный RE31 (Рис. 4В) [28]. Константа диссоциации комплекса с тромбином составила 0,56 нМ [28,86], что сопоставимо с константой для комплекса 31ТБА с тромбином. Молекула состоит из модуля HD1, т.е. G-квадруплекса длиной 15 нуклеотидов, соединенного двумя спейсерами по 2 нуклеотида с дуплексным модулем длиной 6 п.о. Аптамер имеет высокое сродство и увеличивает время свертывания крови по сравнению с HD1 [86]. Исследования, проведенные для усеченных вариантов RE31, показали, что стабильность модуля GQ снижается с укорочением дуплексного модуля. Для RE31 рентгеноструктурным анализом показано, что повышенное сродство таких аптамеров происходит не за счет образования дополнительных взаимодействий между дуплексом и тромбином [86]. Вероятным объяснением повышения аффинности является оптимизация взаимодействия G-квадруплекса с белком.

Аптамер NU172, также известный как ARC2172 (Рис. 4Г), представляет собой 26-мерный ДНК- олигонуклеотид с улучшенным сродством к тромбину. Константа диссоциации комплекса тромбина с аптамером NU172 - 0,29 нМ [87], что в 30 раз ниже, чем у комплекса HD1-тромбин. Антикоагулянтная активность оказалась в 1,5 раза выше по сравнению с HD1 [91]. NU172 взаимодействует с экзосайтом I тромбина подобно HD1. Согласно кристаллографическим исследованиям, аптамер состоит из GQ и дуплексного модулей, образующих единую стэкинг-систему за счет структурирования соединяющих петель [92].

1.3. Димеры аптамеров к тромбину

Интересным подходом химического изменения структур G-квадруплекса является разработка конъюгатов, состоящих из двух модулей G-квадруплекса, называемых бивалентными аптамерами или димерами аптамеров. Компоненты могут иметь как разные, так однотипные мишени, но чаще это комбинация аптамеров, связывающих разные сайты одного и того же белка. Этот подход обеспечивает более высокую аффинность связывания по сравнению с исходными аптамерами, что является результатом высокой скорости повторного связывания и лучшей селективности по мишеням [38-41].

1.4.1. Ковалентные димеры аптамеров к тромбину

Одна из первых попыток объединения двух G-квадруплексов была предпринята для тромбин связывающих аптамеров [93]. Тромбин-связывающие аптамеры HD1 и HD22 были ковалентно соединены через линкеры, содержащие от 5 до 10 единиц спейсера 18 [94]. Использование аптамеров к разным сайтам тромбина в составе одной конструкции обусловили кооперативность их действия, что увеличило аффинность к тромбину [93].

Другой аптамер THR7, который состоит из HD1 и HD22, соединенных линкером длиной 10 нуклеотидов, обладал аффинностью в 65 раз выше, чем HD1 [60,94]. Вышеупомянутая система также использовалась группой Mauger, однако был использован линкер из 5, 15-ти dA (Рис. 5А) [60]. Как и в предыдущем исследовании, использовались две длины линкера: 5 и 15 нуклеотидов (HD1-5dA-60,29 и HD1-15dA-60,29). Показано, что применение более длинного линкера (HD1-15dA-

60,29) придает значительное улучшение сродства двухвалентного аптамера к молекуле тромбина (Табл. 1) и антикоагулянтной активности аптамера, а именно увеличение времени свертывания при одновременном снижении концентрации аптамера в 30 раз [94].

Таблица 1. Сравнение K_d аптамеров (мономеров и димеров с линкером из dA). Красным цветом выделены димеры аптамера, сконструированные с помощью модуля аптамеров HD1(к экзосайту I) и 60,29 (к экзосайту II) с полиА. Приведены две константы: к экзосайту I и II [60].

Аптамеры/ Димеры аптамеров	$K_d, \text{нМ}$ (к экзосайту I)	$K_d, \text{нМ}$ (к экзосайту II)
HD1	$123,1 \pm 7,2$	
60,29		$11,9 \pm 1,1$
HD1-15dA-60,29	$4,9 \pm 1,6$	
		$51,8 \pm 5,3$
HD1-5dA-60,29	$5,8 \pm 1,7$	
		$30,7 \pm 3,4$
HD1-15dA	$50,9 \pm 6,3$	
60,29-15dA		$4,3 \pm 2,0$

Разработаны конструкции, состоящие из двух аптамеров к тромбину, соединенных линкером от 0 до 20 нуклеотидов [57]. Димер аптамера, имеющий длинный линкер (длиной 20 нуклеотидов), - наиболее эффективный ингибитор тромбина в реакции гидролиза фибриногена. Все предложенные конструкции обладали большей аффинностью, чем исходные аптамеры (Табл. 2).

Другой интересной концепцией была конструкция гомодимера, названного RA-36, состоящего из двух модулей HD1, ковалентно связанных одним тимидиновым остатком (Рис. 5В) [95].

Один модуль HD1 отвечает за ингибирующую активность конъюгата, а другой модуль является эффектором первого. Т.е. в данном случае нет двух независимых модулей. Димерный аптамер обладал антикоагулянтной

активностью, сопоставимой с 31ТБА, обладая на порядок меньшей аффинностью к тромбину [95]. Получены димерные аптамеры из двух модулей HD1, 3'-концы которых соединены линкерами из остатков аденина или тимина и/или глицерина (Рис. 5Г). В этой конструкции аптамеры были устойчивы к деградации экзонуклеазами. Топология GQ в конструкции сохранена.

Таблица 2. Сравнение K_d аптамеров (мономеров и димеров с линкером из dT). Красным цветом выделены димеры аптамера, сконструированные с помощью модуля аптамеров HD1(к экзосайту I) и 60,29(к экзосайту II) с полиТ. Приведены две константы: к экзосайту I и II [57].

Аптамеры/ Димеры аптамеров	K_d ,нМ (к экзосайту I)	K_d ,нМ (к экзосайту II)
HD1	$20,2 \pm 2,1$	
60,29		$3,5 \pm 1,1$
HD1-60,29	$0,14 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
HD1-5dT-60,29	$0,06 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
HD1-10dT-60,29	$0,74 \pm 0,25$	$0,52 \pm 0,15$
HD1-20dT-60,29	$0,35 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,1$

Большинство димеров проявляют высокую антикоагулянтную активность и повышенную устойчивость к расщеплению нуклеазами в сыворотке по сравнению с HD1 и RA36 [95].

Еще одним подходом димеризации стало получение циклических структур с двумя или более модулями GQ-аптамеров [69]. Полученные димерные кольцевые конъюгаты характеризовались значительным повышением термической и биологической стабильности. Гетеродимеры обладали антикоагулянтной активностью почти в два раза большей, чем исходный аптамер. Как и можно было предсказать, наибольшая

аффинность и ингибирующая активность наблюдается для гетеродимерных конструкций за счет одновременного взаимодействия с двумя с аятами тромбина.

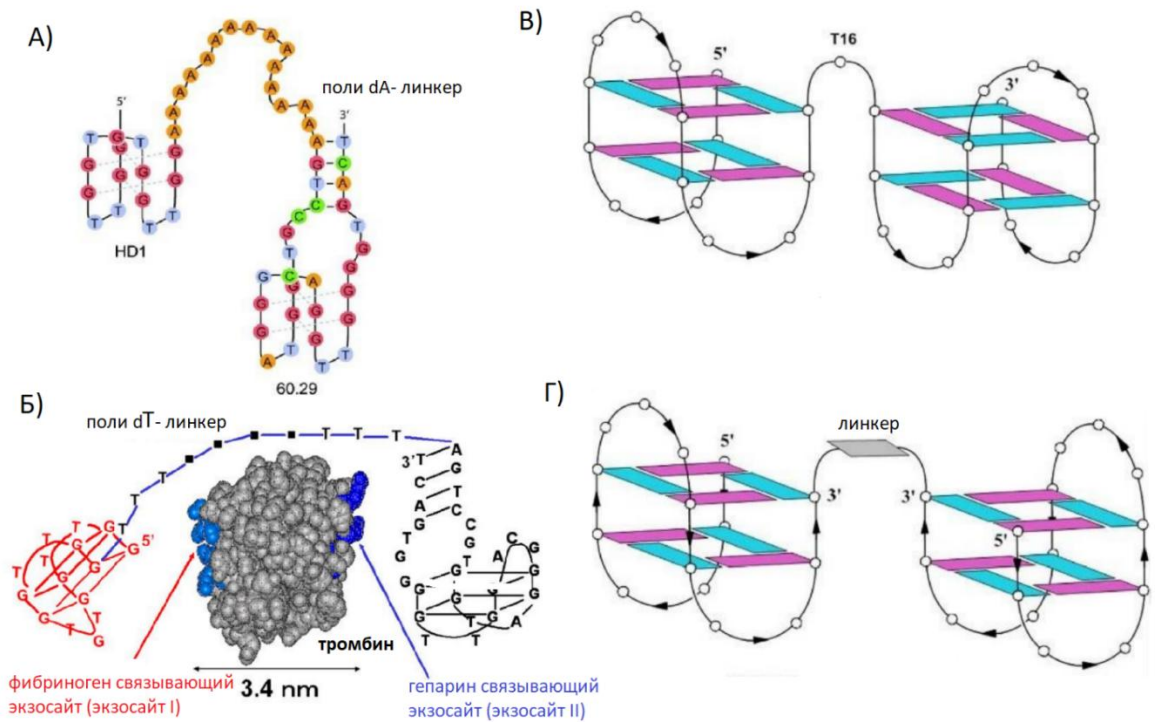


Рисунок 5. Ковалентные гетеро- (А,Б) и гомо- (В,Г) димеры ДНК-аптамеров к тромбину. А- HD1+HD22 с линкером из поли dA, Б- HD1+HD22 с линкером из поли dT, В- HD1+HD1 с линкером Т (RA-36), Г- модель гомодимера HD1, в котором 3'-концы аптамеров соединены линкером.

1.4.2. Нековалентные димеры аптамеров к тромбину

Помимо ковалентной димеризации, димерные конструкции аптамеров также могут быть получены путем нековалентной сборки [80]. Сконструированы гомодимер HD1 (FF) и гетеродимер HD1 и HD22 (FH), соединенные дуплексным «замком» длиной 15 пар нуклеотидов и тимидиновыми линкерами длиной 5 нуклеотидов (Рис. 6А и 6Б) [96].

Показано, что образование димеров незначительно влияло на термическую стабильность G-квадруплексных модулей ($T_{пл}$ для HD1 и HD22 с дополнительной одноцепочечной частью составляла 40,5°C и 44,3°C, что на несколько градусов выше, чем $T_{пл}$ для гомо и гетеродимеров FF и FH - 38,1°C и 40,1°C соответственно) и дуплексных фрагментов ($T_{пл}$ для отдельного дуплекса составляла 46,3°C, а $T_{пл}$ дуплекса в FF и FH составила 47,7°C и 48,5°C). Оба димерных аптамера характеризовались улучшением в 40 раз антикоагулянтных свойств по сравнению с исходным HD1. Описанная система успешно использовалась для разработки платформы аптасенсоров, предназначенной для обнаружения тромбина с помощью биотинилированных димерных аптамеров, иммобилизованных на поверхности золота, покрытого авидином [97].

Нековалентная димеризация обеспечивает эффект, сходный с ковалентной сшивкой через длинный линкер, обеспечивающий независимость двух модулей аптамеров: как в случае гомодимерного аптамера с помощью межмолекулярного дуплекса (аптамер FF), так и в случае межмолекулярного G-квадруплекса (Рис. 6) [80].

Ингибирующая активность димеров в два раза выше, чем у мономерного аптамера, что в первую очередь, связано с повышением концентрации аптамерных модулей [80]. Показано, что предел обнаружения аптасенсора с аптамером FF в 3 раза выше, чем у аптамера HD1. Подобные наноконструкции с межмолекулярными дуплексами были построены из трех и четырех олигонуклеотидов, каждый из которых содержал аптамерный модуль [80]. Олигомеризация аптамеров может использоваться для изменения фармакокинетики и фармакодинамики аптамеров *in vivo*, поскольку на эти свойства оказывает влияние молекулярная масса молекулы. Двумя основными причинами неудовлетворительной фармакокинетики и фармакодинамики немодифицированных аптамеров являются расщепление нуклеазами в

биологических тканях и быстрый почечный клиренс из кровотока. Расщепление нуклеазами может быть уменьшено модификацией олигонуклеотидов, тогда как повышение молекулярной массы, например, за счет конъюгации с полиэтиленгликолем значительно снижает почечный клиренс [98]. Время жизни полиэтиленгликоля в кровотоке зависит от молекулярной массы макромолекулы; полимеры 20 кДа и выше полностью исключают почечную экскрецию [98].

Олигомеризация немодифицированных аптамеров незначительно влияет на эффективность расщепления нуклеазами, но может быть хорошей альтернативой конъюгации с полиэтиленгликолем. В клинических испытаниях ПЭГилированного аптамера было показано, что ПЭГ вызывает иммунные реакции, что привело к остановке дальнейших клинических испытаний. Возникают опасения по поводу безопасности в связи с внедрением фрагментов ПЭГ с высокой молекулярной массой в модификации аптамеров. Соответственно, по-прежнему желательно искать компоненты не вызывающий аллергических реакций, для разработки эффективных терапевтических аптамеров длительного действия [99].

Хотя межмолекулярные G-квадруплексы уже были тщательно изучены, их использование в составе межмолекулярных конструкций для мультимеризации ДНК ограничено несколькими примерами. Тетрамолекулярные параллельные G-квадруплексы были использованы для конъюгации пептидомиметиков, которые связывают и ингибируют химотрипсин, и для создания двух пептидных петель, расположение которых соответствует расположению петель в белке [129].

Первые данные для наноконструкций на основе аптамеров с межмолекулярным G-квадруплексом были предложены Завьяловой и Копыловым [80] как альтернативный способ продления жизни аптамера *in vivo*. Два аптамера HD1 были соединены димерным межмолекулярным G-квадруплексом (Рис 6В). Для межмолекулярных конструкций предсказана топология димерного антипараллельного G-квадруплекса, соединяющего два

внутримолекулярных антипараллельных G-квадруплекса. Поскольку и аптамер HD1, и межмолекулярные конструкции являются G-квадруплексами, существует очевидное усложнение конформационной однородности всей наноконструкции.

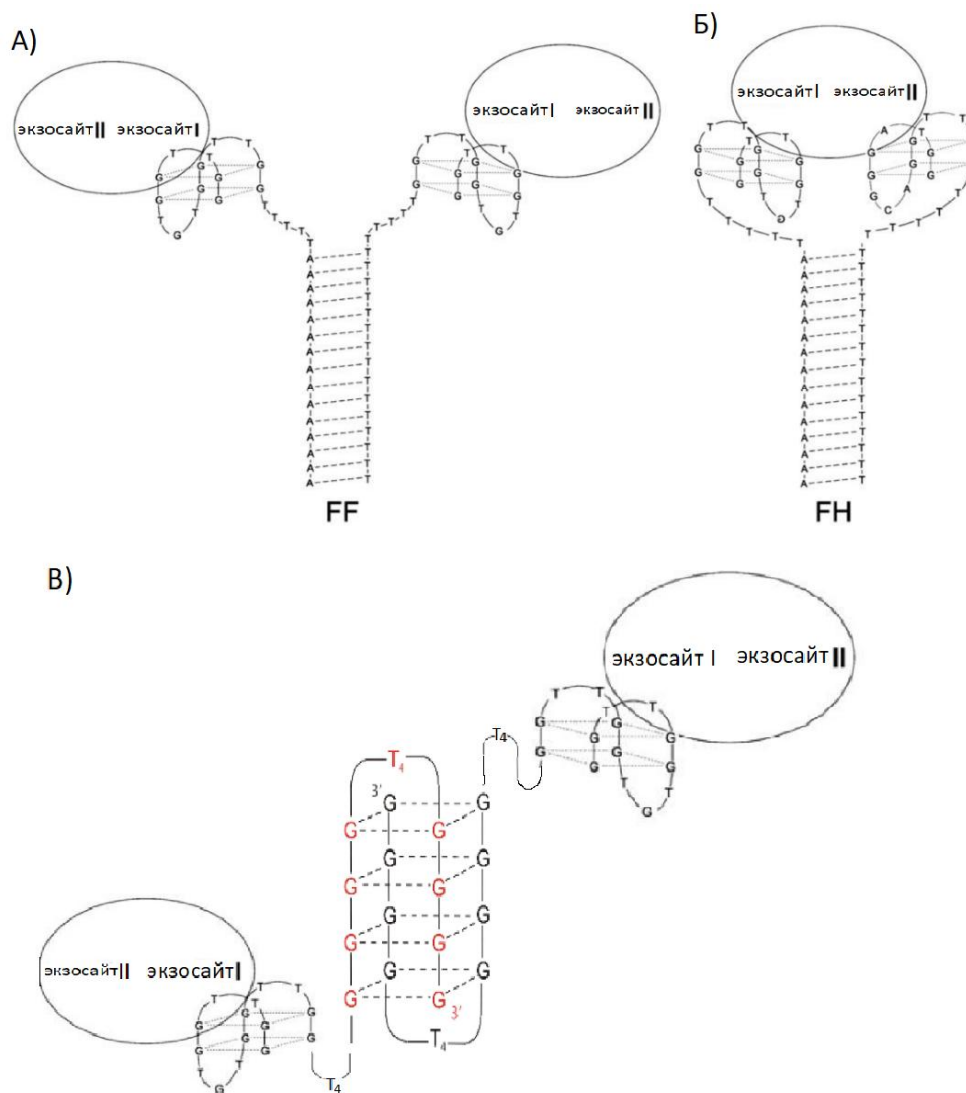


Рисунок 6. Нековалентные димеры аптамеров с дуплексным замком (А, Б), G-квадруплексным замком (В). Структура аптамера FF (А), FH (Б), GL2-HD1 (В).

Наиболее успешные примеры, димерные аптамеры GL1-HD1 и GL2-HD1, сохраняют высокую ингибирующую активность и имеют измененную фармакодинамику у крыс. Ожидаемые молекулярные массы

этих наноконструкций составляют около 20 кДа, что в четыре раза выше, чем у аптамера HD1, тогда как время полувыведения внутривенно введенных аптамеров в кровотоке составляет около 40-60 мин, что значительно превышает период полувыведения аптамера (4 мин для аптамера HD1) [80]. Эти самые первые данные стимулируют дальнейший поиск наноконструкций ДНК, которые обеспечивают увеличенное время жизни и измененное биораспределение аптамеров *in vivo*.

1.5. EGFR как маркер опухолевых клеток.

Рост, дифференциация и пролиферация клеток - тщательно регулируемые процессы. Нарушения этих процессов часто связаны со злокачественными опухолями. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), член семейства ErbB / HER рецепторов трансмембранных тирозинкиназ типа I, вовлечен в многочисленные виды рака. В здоровой физиологии рецепторы ErbB играют центральную роль в росте и развитии тканей, замедляя дифференцировку и морфологию клеток [100,101].

Различные факторы роста, включая эпидермальный фактор роста, служат лигандами для этого семейства рецепторов. При связывании лиганда происходит гомо- или гетеродимеризация рецепторов, что приводит к аутофосфорилированию остатков тирозина цитоплазматических доменов. Затем инициируются два основных нисходящих сигнальных пути: сигнальный каскад Ras и сигнальный каскад PI3K [102].

Эти нисходящие каскады приводят к делению клеток, дифференцировке и пролиферации. Кроме того, димеризованный EGFR также может интернализироваться в ранние эндосомы. Из этих ранних эндосом EGFR может либо возвращаться обратно в мембрану, либо разрушаться.

Было показано, что сверхэкспрессия рецепторов ErbB, особенно EGFR, вызывает ошибочную и неконтролируемую пролиферацию клеток, что

приводит к злокачественным опухолям [103]. Кроме того, повышенная активация EGFR была связана со снижением апоптоза, увеличением метастазов и повышенным ангиогенезом - отличительными признаками раковых клеток [103].

Разработаны многочисленные ингибиторы и лиганды EGFR, включая моноклональные антитела (mAb) и низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы. Аптамеры представляют собой привлекательную альтернативу моноклональным антителам из-за простоты их синтеза и отсутствия иммуногенности [100-103].

Таким образом, терапевтические средства на основе ингибиторов или лигандов EGFR – перспективное направление противораковых терапевтических средств.

1.6. Аптамеры к EGFR

К настоящему времени описано более 30 олигонуклеотидных аптамеров к EGFR [104-114]. Некоторые из них связываются как с рекомбинантными белками, так и с клетками с константами диссоциации в диапазоне 0,3-100 нМ [105,110,112].

Одна из первых работ по аптамерам к EGFR была сделана группой Эллингтона, где был создан РНК-аптамер - аптамер J18, который связывал белок EGFR с константой диссоциации 7 нМ [110]. Очищенный белок использовался для селекции аптамеров в качестве димера (слиянием IgG). Для оценки связывания рецептора на клетках выбрана клеточная линия эпидермоидной карциномы A431. Для клеток линии A431 показана сверхэкспрессия EGFR, поэтому они служат модельной клеточной линией для изучения EGFR и EGFR терапии. Группой Эллингтона был проведен аналогичный отбор с модифицированными 2'-

фторпиримидином рибонуклеотидами, в результате чего получен аптамер E07.

Описаны ДНК-аптамеры U2, U8, U31, которые высокоаффинно связываются с EGFR ($K_d = 3,4, 4,4$ и $8,1$ нМ), Аптамер U31 был укорочен в 1,5 раза, и его последовательность была изменена для уменьшения числа возможных конформаций, в результате чего были получены аптамеры GR20 и GR200 [115]. Аптамер GR20 будет исследован в нашей работе, поэтому рассмотрим его структуру подробнее.

Аптамер U31 представляет собой 76-мерный олигонуклеотид с предполагаемой структурой типа «шпилька» (Рис. 7). Программное обеспечение RNAfold показало более трех возможных вторичных структур, поэтому на основе аптамера U31 были сконструированы два ДНК-аптамера, в которых количество возможных конформаций уменьшено за счет изменения длины и последовательности аптамера (Рис. 7). Аптамер GR20 имеет только две предполагаемые вторичные структуры: структуру с минимальной энергией и структуру с развернутой короткой шпилькой, в которой разорваны 3 пары А-Т. Термическая стабильность GR20 невелика: $T_{пл}$ составила всего $27,9^{\circ}\text{C}$.

Сродство, как U31, как к EGFRvIII (EGFR с делецией части внеклеточного домена, первичная мишень отбора аптамера), так и к EGFRwt (полноразмерный EGFR). Константы диссоциации приведены в Табл. 3.

Модификация аптамера путем введения пиренового заместителя привела к увеличению сродства к EGFRvIII, тогда как сродство к EGFRwt было увеличено только в случае модификации аптамера GR200 по третьему положению (Рис. 7).

Из РНК-аптамеров многообещающим для дальнейшей разработки являются аптамер E07, который связывается с EGFRwt с $K_d = 2,4$ нМ, а также аптамер J18 ($K_d = 7$ нМ). Аптамер E07 был укорочен до варианта MinE07 (mE07) с сохранением функциональной активности и аффинности [116]. Аптамер MinE07 связывает EGFR с высокой аффинностью ($K_d \sim 1$ нМ) [116].

Таблица 3. ДНК- и РНК-аптамеры к EGFR и константы диссоциации (K_d) их комплексов с EGFRwt [114-116].

Аптамер	Последовательность 5'-3'	K_d (нМ)	Тип НК
U2	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTTGACGCTT TATCSTTTTCTTATGGCGGGATAGTTTCGT GGACACGGTGGCTTAGT	3,4±0,1	ДНК
U31	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGTTTAATA TGTTTTTTA ATTCCCCTTGTGGTGTGTTGTGGACACGG TGGCTTAGT	3,7±0,7	ДНК
GR20	ACGCACCATTTGTTTAATATGTTTTTTAAT TCCCCTTGTGGTGTGT	5±2	ДНК
GR200	CGACGCACCATTTGTTTAATATGTTTTTTA ATTCCCCTTGTGGTGCCTCG	5±2	ДНК
E07	GGCGCUCGCGCUCUGUGCCGCUAUAUAAUGC ACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGCAUG UCAAAAGCCGUGUAGCACAGCAGA	2,4±0,1	РНК
MinE07 (mE07)	GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGCA UGUCAAAAGCCGGAACCGUCC	1,0±0,1	РНК

В результате единичная химическая модификация увеличивала сродство к EGFRwt в 7,5 раз, тогда как сродство к EGFRvIII увеличивалось в 2-4 раза. Как немодифицированные (GR200), так и модифицированные пиреном (GR200-Pyr03) аптамеры были протестированы в экспериментах по связыванию клеток. Проточная цитофотометрия для линии клеток со сверхэкспрессией EGFR (A431) и контрольных линий клеток (MCF7 с низкой экспрессией EGFR и С6 глиомы крысы без экспрессии человеческого EGFR) выявила

проточной цитометрии. При этом аптамер J18 легко подвергается гидролизу под действием нуклеаз, так как не содержит модификаций [112].

На основе полипептидов и антител были созданы мультивалентные конструкции для их повышения эффективности, что выразалось в увеличении аффинности, усилении ингибирующего действия или активации передачи сигналов рецептора [118]. Эти результаты позволили предположить, что НК-аптамеры также могут проявлять такие эффекты avidности. Для повышения эффективности мономерных аптамеров к EGFR были созданы различные димерные конструкции MinE07 для увеличения сродства и связывания с более высокой скоростью.

Димерные конструкции аптамера MinE07 были созданы с помощью дуплексного «замка», спейсеров и линкеров разной длины (Рис. 8). Сборку димера оценивали с помощью электрофореза. Было исследовано влияние ориентации мономеров в димерной конструкции и длины линкера между двумя мономерами на эффективность сборки и аффинность конструкции к EGFR. Конструкции собирались с использованием нескольких подходов. Во-первых, для мечения аптамеров использовали комплементарные ДНК-олигонуклеотиды, содержащие флуорофоры (флуоресцеин, ФАМ). Во-вторых, добавление одноцепочечных фрагментов к аптамерам использовалось для образования дуплексного замка между двумя аптамерами. В-третьих, ковалентный димер был получен путем транскрипции с матрицы оцДНК [116].

Для оценки влияния расстояния между двумя аптамерами на аффинность были использованы три спейсера разной длины (3, 9 и 18 звеньев) в ДНК-олигонуклеотиде, образующем межмолекулярный замок с РНК-аптамерами - конструкция 1 (MinE07.A + MinE07.B + комплементарная ДНК, меченая ФАМ и содержащая внутренний спейсер) (Рис 8А, Рис. 9-3). Данные показывают, что независимо от длины

внутреннего спейсера димерной конструкции аффинность к EGFR не изменяется. Это означает, что конструкция не взаимодействует с двумя EGFR одновременно и не индуцирует димеризацию EGFR.

Для оценки влияния ориентации аптамеров в димерных конструкциях аптамеры были димеризованы голова к хвосту (5' концами, обращенными в противоположных направлениях) – конструкции 2 и 3 и голова к голове (5' концами, обращенными в одном направлении) – конструкция 1. Конструкция 3 получена из MinE07A и MinE07B с химической сшивкой за счет ССМК (сульфо-N-сукцинимидил-4-(maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) в составе ДНК конструкции (5'-/6-ФАМ/САТТТАGGАССААСАСАА-/HS/-SMCC-/₂HN/- ААААААААТТСАТСТТСАССАСТАС-3'). Димеры в направлении голова к хвосту показали лучшую аффинность, по сравнению с ориентацией голова к голове [116].

Дальнейшие эксперименты показали, что состояние клеток (конфлюэнтные или в стадии роста) и то, выполняется ли исследование с прикрепленными клетками (связанными с культуральными колбами или лунками) или с неприкрепленными клетками (трипсинизированные клетки), оказывает огромное влияние на сродство аптамеров. Аффинность MinE07 к трипсинизированным клеткам значительно снижена.

Другой переменной, которая была изучена, было расстояние между аптамерами. Конструкция 1 показывает, что расстояние внутри аптамера не влияет существенно на аффинность связывания. Тем не менее, из этого эксперимента нельзя сделать однозначных выводов о возможности взаимодействия с димерами EGFR на клеточной поверхности.

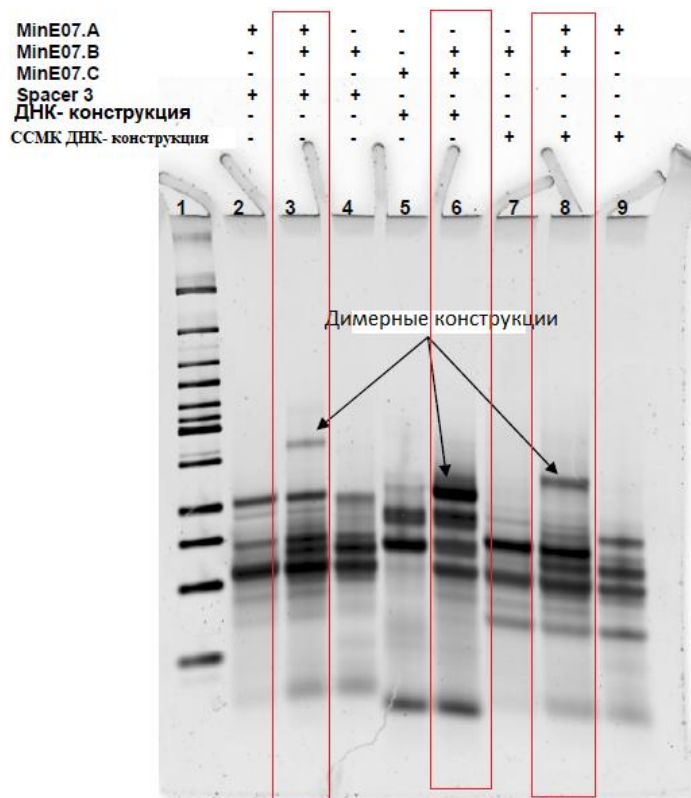


Рисунок 9. Оценка сборки димерной конструкции в 12% полиакриламидном геле (ПААГ); 1 – 25 п.о.; 2 – MinE07.A + комплементарная ДНК, меченая ФАМ и содержащая внутренний спейсер 3; 3 – MinE07.A + MinE07.B + комплементарная ДНК, меченая ФАМ и содержащая внутренний спейсер 3 (конструкция 1); 4 – MinE07.B + комплементарная ДНК, меченая ФАМ и содержащая внутренний спейсер 3; 5 – MinE07.C + комплементарная ДНК, меченая ФАМ; 6 – MinE07.B + MinE07.C, соединенные межмолекулярным РНК-дуплексом, + комплементарная ДНК, меченая ФАМ (конструкция 2); 7 – MinE07.B + комплементарная ДНК, меченая ФАМ и содержащая ССМК-линкер; 8 – MinE07.A + MinE07.B + комплементарная ДНК, меченая ФАМ и содержащая ССМК-линкер (конструкция 3); 9 – MinE07.A + комплементарная ДНК, меченая ФАМ и содержащая ССМК-линкер.

Аптамеры были использованы в качестве имитатора фактора роста гепатоцитов (HGF), который после связывания и стимулирования димеризации рецептора Met стимулирует клеточную пролиферацию,

дифференцировку и миграцию (Рис. 10А) [118]. Две копии аптамера-миметика HGF были связаны через одноцепочечный или двуцепочечный ДНК-линкер длиной от 0 до 60 нуклеотидов. Теоретически каждый аптамер должен был связаться с рецептором Met, а линкер стимулировать димеризацию двух рецепторов, аутофосфорилирование и индукцию пролиферативной передачи сигналов.

Интересным подходом может быть замена димера аптамеров, соединенных линкером, на два аптамера, способных образовать тройной комплекс с триггерной (мостиковой) молекулой (Рис. 10Б) [119].

После добавления триггерной молекулы два аптамера индуцируют димеризацию аптамеров-миметиков HGF, способствуя связыванию Met. Таким образом, лиганд, который активирует рецептор путем его димеризации, может быть функционально заменен любой молекулой, выбранной для связывания мостиковых аптамеров.

Двухвалентные конструкции с короткими и гибкими линкерами показали самые высокие скорости фосфорилирования Met в испытаниях с Met-экспрессирующими клетками A549, вероятно, из-за повышенной димеризации Met.

В экспериментальной работе тромбин был использован в качестве внешнего триггера для связывания с двумя тромбин-специфичными аптамерами и димеризации Met-специфических аптамеров. Использование мостиковых аптамеров, распознающих фактор роста тромбоцитов (PDGF), сделало передачу сигналов Met чувствительной к PDGF. Метод должен быть применим к множеству триггерных молекул, если они имеют два сайта связывания для аптамеров.

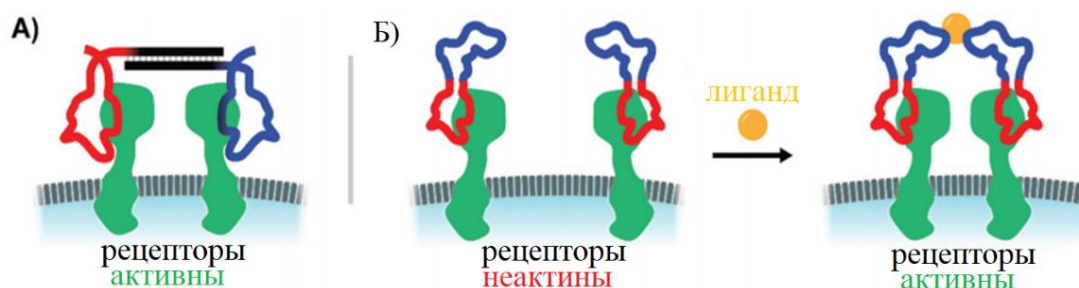


Рисунок 10. Стратегии подходов к димеризации аптамеров к димерным мишеням [118,119].

Аптамеры составляют большую и перспективную группу молекулярных инструментов на основе нуклеиновых кислот с высоким терапевтическим потенциалом. Интересно, что аффинность и биологическую активность аптамеров можно повышать путем добавления дополнительных структурных элементов, например, добавляя дуплексные модули к G-квадруплексным или объединяя несколько аптамерных модулей в гомо- или гетеро-олигомеры. Для узнавания мономерных белков обычно используется комбинация двух аптамеров к разным сайтам этого белка, что создает бивалентность конструкции и увеличение аффинности. Наноконструкции, собранные из однотипных аптамеров перспективны для узнавания димерных или олигомерных белков. При этом состав и длина линкера, соединяющего модули аптамеров существенны для образования активной конформации аптамера, взаимодействия с мишенью и функциональной активности наноконструкции в целом. Важно отметить, что высокая биологическая активность олигомерных аптамеров может быть достигнута за счет применения как конъюгации аптамеров, так и нековалентного соединения двух модулей с использованием межмолекулярных ДНК-замков. Для каждого объекта необходимо проводить индивидуальный подбор способа объединения аптамеров в конструкцию.

ГЛАВА 2. НЕКОВАЛЕНТНЫЕ ДИМЕРЫ АПТАМЕРОВ К ТРОМБИНУ И РЕЦЕПТОРУ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот можно использовать для разработки мультивалентных систем путём сборки с использованием межмолекулярных конструкций («замков») различной природы (Рис 11). Межмолекулярные G-квадруплексы были тщательно изучены, однако их использование в качестве «замка» в межмолекулярных конструкциях ограничено.

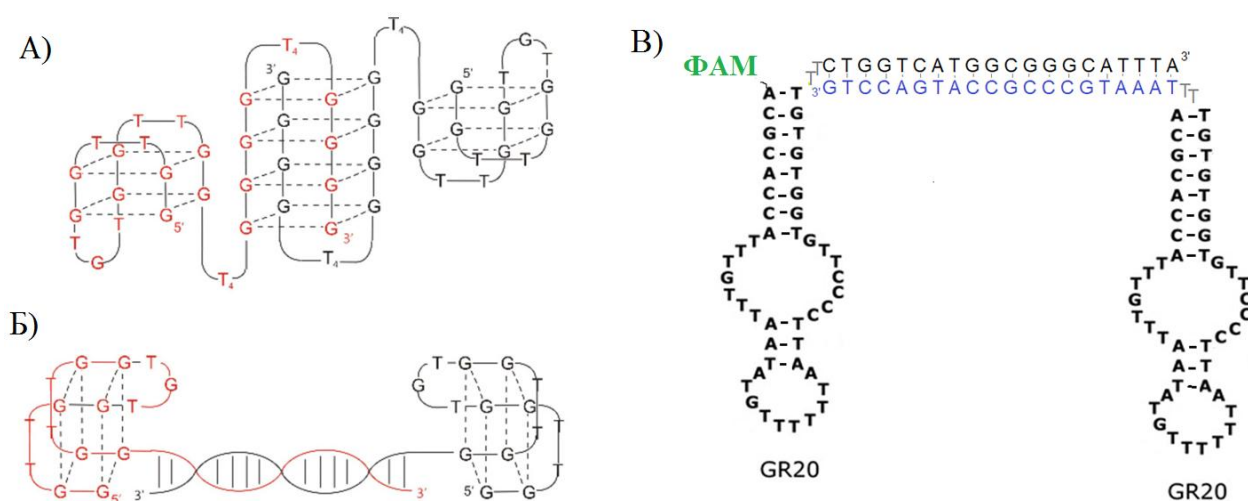


Рисунок 11. Предполагаемые структуры нековалентных димеров аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом, T4T4(A), дуплексом dHD1-14ds (Б) и димера ДНК-аптамера к EGFR, dGR20-20ds, с межмолекулярным дуплексом (В).

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.

2.1. Димеры аптамеров к тромбину

2.1.1. Количественная оценка выхода димерных наноконструкций

2.1.1.1. Электрофорез в полиакриламидном геле

Конструкции димеров аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом (T4T4, Рис.11А) и дуплексом (dHD1-14ds, Рис.11Б) анализировали с помощью гель-электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) (Рис. 12). Конструкции собирали при концентрации 1000 мкМ в буфере буф6.10К (20 мМ Трис·НСl, 140 мМ NaCl и 10 мМ KCl при рН 7,0) перед экспериментом. Аптамеры разбавляли до необходимой концентрации (10 мкМ, 100 мкМ) в том же буфере. Основным препятствием традиционного ПААГ является необходимость окрашивания геля, при этом красители не могут окрашивать G-квадруплексы с такой же эффективностью что двуцепочечную ДНК. Например, SYBR Green II окрашивает одноцепочечную ДНК в 1,5 раза менее эффективно, чем двуцепочечную, а эффективность окрашивания G-квадруплексов снижена примерно в 5 раз, поэтому четкость окрашивания олигонуклеотидов с межмолекулярным G-квадруплексом в разы ниже по сравнению с двуцепочечной ДНК. Из-за чего появляются белые или

размытые полосы в геле для собранных G-квадруплексах (Рис. 12). Еще одна проблема - перегрузка геля высокими концентрациями ДНК, что приводит к высокому фоновому сигналу (Рис. 12). Все эти проблемы усложняют интерпретацию ПААГ; однако очевидно, что как мономерные, так и димерные аптамеры присутствуют при сборке конструкций при концентрации олигонуклеотидов 1 мМ. По данным электрофореза в ПААГ аптамер с межмолекулярным дуплексом (dHD1-14ds) является преимущественно димером, тогда как аптамер с межмолекулярным G-квадруплексом (T4T4) содержит как мономерную, так и димерную структуру, с преобладанием мономера (Рис. 12).

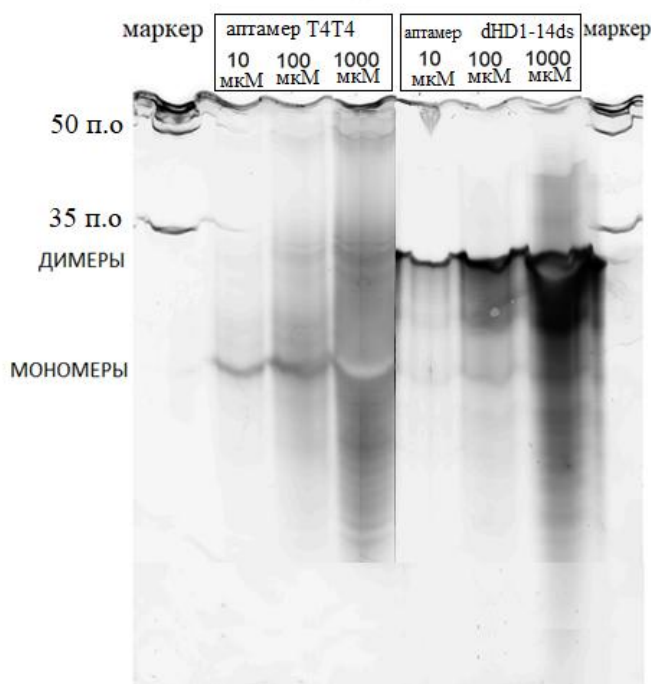


Рисунок 12. Гель-электрофорез димерных аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом (T4T4) и дуплексом (dHD1-14ds) в 12% полиакриламидном геле. Концентрации для сборки наноконструкций (μM) указаны над рисунком.

2.1.1.2. Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Для калибровки колонки на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было выполнено разделение набора дуплексов разной длины O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (от 10 до 300 пар оснований). Удалось добиться разделения в диапазоне длин дуплексов 10–100 пар оснований (Рис. 13). Анализ был проведен в двух подвижных фазах: ПФ1 (60 mM KH_2PO_4 , 140 mM K_2HPO_4 pH 6,85 и 10 об.% ацетонитрила, черная линия, Рис. 13) и ПФ2 (11 mM KH_2PO_4 , 9 mM K_2HPO_4 , pH 6,85, 160 mM Na_2SO_4 и 10 об.% ацетонитрила), в которой фосфат калия был заменен на сульфат натрия.

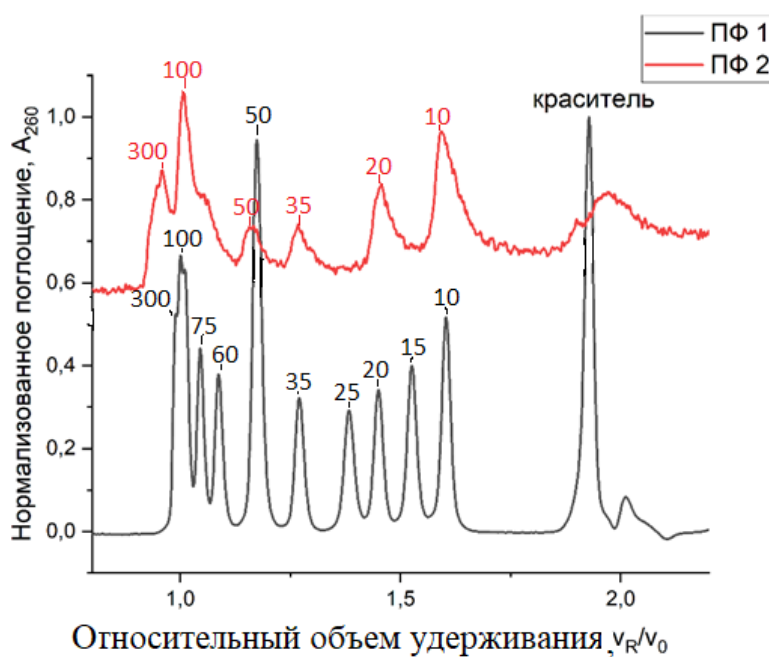


Рисунок 13. Влияние состава подвижной фазы на эффективность разделения дуплексов разной длины (10-300 п.о.). ПФ1 – подвижная фаза 1 (60 mM KH_2PO_4 , 140 mM K_2HPO_4 pH 6,85 и 10 об.% ацетонитрила) – черная линия и ПФ2 – подвижная фаза 2 (11 mM KH_2PO_4 , 9 mM K_2HPO_4 , pH 6,85, 160 mM Na_2SO_4 и 10 об.% ацетонитрила) – красная линия.

Концентрация соли не менее 200 мМ – необходимое условие для эффективного разделения с помощью эксклюзионной ВЭЖХ.

Градуировочная кривая для ПФ 1 была аппроксимирована линейной зависимостью с $R^2 = 0,99$. Следующее уравнение $\log_{10}M = -1,541 v_R / v_0 + 6,337$ было использовано для оценки степени олигомеризации аптамеров.

Степень олигомеризации исходного аптамера HD1 и его ковалентного димера RA36 оценивали по данным эксклюзионной хроматографии с использованием калибровочной кривой, полученной из дуплексов в подвижной фазе 1. «Степень олигомеризации» соответствует числу олигонуклеотидов в конструкции. Хроматограмма HD1 имеет единственный пик с относительным удерживаемым объемом $v_R / v_0 = 1,66$ (Рис. 14А). Это значение относительного удерживаемого объема выходит за пределы диапазона калибровки. Формальный расчет дает степени олигомеризации 1,3 (Табл. 4).

Ковалентный димер аптамера HD1, RA-36, имеет основной пик при $v_R / v_0 = 1,52$ (94%) и второстепенный пик при $v_R / v_0 = 1,33$ (6%) (Рис. 14Б). Рассчитанные значения степени олигомеризации были 1,0 для основного пика и 2,0 для второго пика (Табл. 4). Таким образом, RA36 является преимущественно мономолекулярным (94%) и содержит небольшие количества димера (6%). Примечательно, что для HD1 и RA36 пики мономолекулярных конструкций были асимметричными, имея плечи с немного меньшими значениями относительных удерживаемых объемов. Предположительно, эти пики соответствуют развернутым конформерам, имеющим такие же молекулярные массы, но увеличенные гидродинамические радиусы. Чтобы проверить природу этих пиков, G-квадруплексы HD1 и RA-36 были собраны с соответствующими комплементарными олигонуклеотидами в стехиометрии 1:1. Полученные дуплексы были симметричными; исчезли пики мономолекулярных G-квадруплексов, а также плечи. Эти результаты подтверждают предположение о существовании двух конформеров, которые могут быть

легко преобразованы в идентичные дуплексы с комплементарными олигонуклеотидами.

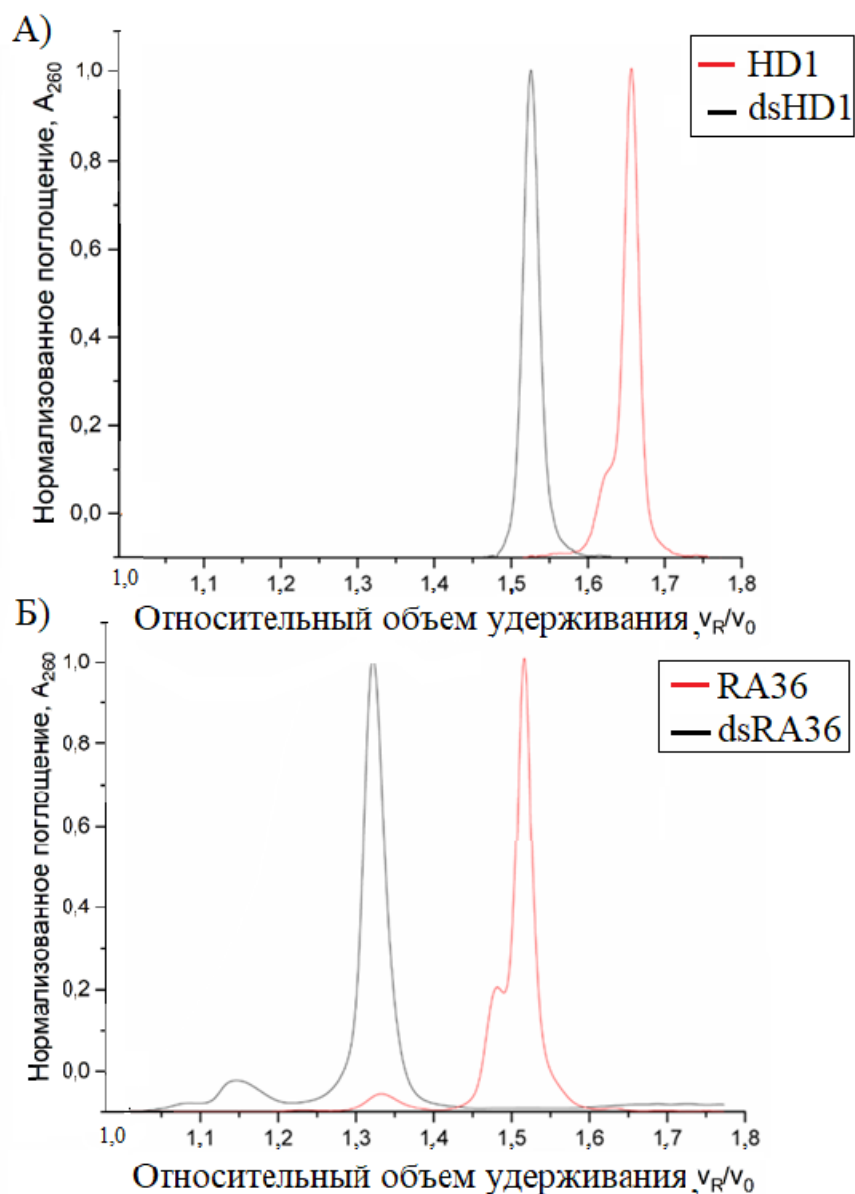


Рисунок 14. Хроматограммы G-квадруплекс-содержащих ДНК-аптамеров к тромбину. А - HD1 (красная линия) и его дуплекс с комплементарным олигонуклеотидом (черная линия). Б – RA-36 (красная линия) – ковалентный димер аптамера HD1 и его дуплекс с комплементарным олигонуклеотидом (черная линия).

Таблица 4. Степень олигомеризации G-квадруплекс-содержащих аптамеров, их дуплексов (ds), образованных после добавления комплементарных олигонуклеотидов, а также димерной конструкции T4T4. MW - молекулярная масса.

Аптамер	Концентрация сборки (мкМ)	Теоретическая молекулярная масса	v_R/v_0	Площадь пика, %	MW, Молекулярная масса по данным ВЭЖХ	Степень олигомеризации
HD1	1000	4721	1,66	100	6 100	1,3
RA36	1000	9611	1,52	94	10 000	1,0
			1,33	6	19 000	2,0
dsHD1	1000	9127	1,53	100	9 700	1,0
dsRA36	1000	18796	1,32	90	20 000	1,0
			1,15	10	37 000	2,0
T4T4(G L2-HD1, GL2)	10	9763	1,56	100	8 700	1,0
	100		1,56	96	8 700	1,0
			1,35	4	18 000	2,0
	1 000		1,56	50	8 700	1,0
			1,35	50	18 000	2,0

2.1.1.2.1. Оценка степени олигомеризации нековалентного димера G-квадруплексного аптамера к тромбину (Т4Т4).

Нековалентные димеры HD1 созданы с помощью межмолекулярного G-квадруплекса (Рис. 11А). Аптамер Т4Т4 (GL2-HD1, GL2) был первым успешным примером нековалентной димеризации с помощью межмолекулярного G-квадруплекса [80]. Для оптимизации условий сборки аптамер Т4Т4 собирали при различных концентрациях (10 мкМ, 100 мкМ, 1000 мкМ) и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии в подвижной фазе 1 (Рис. 15, табл. 4).

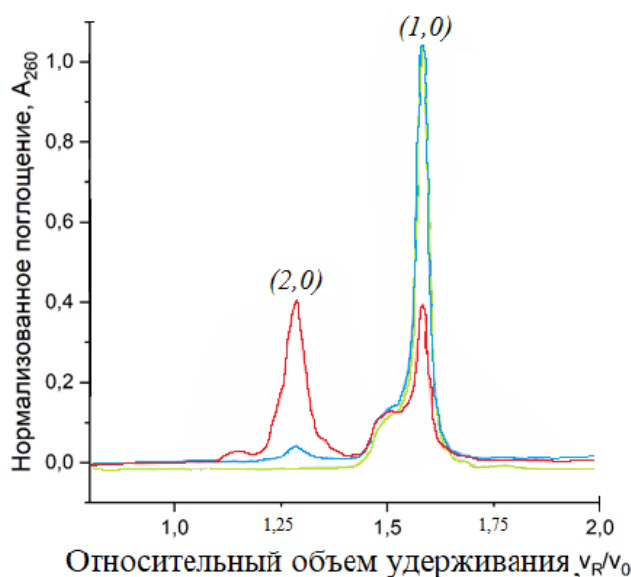
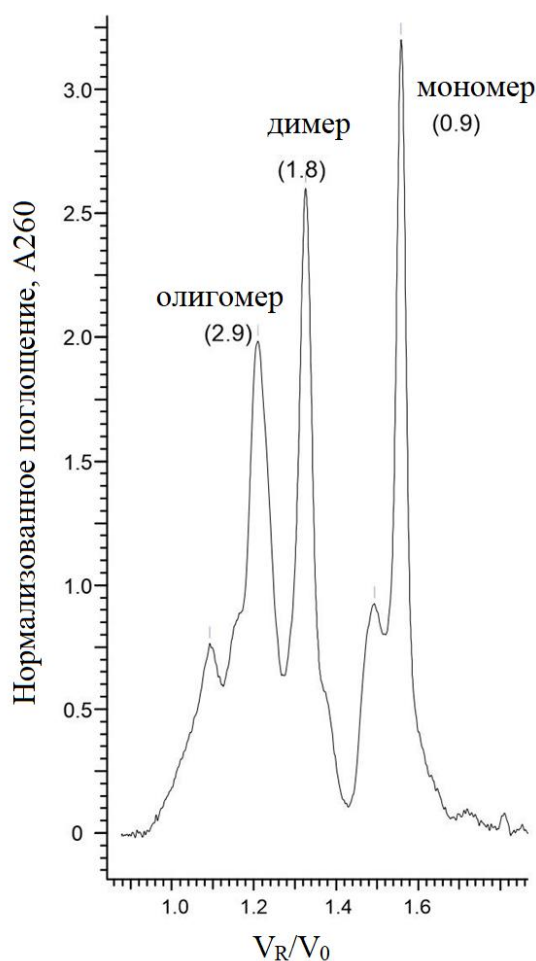


Рисунок 15. Оценка выхода нековалентного димера аптамера к тромбину Т4Т4 методом ВЭЖХ. Конструкция Т4Т4, собрана в различных концентрациях: 10 мкМ (зеленая линия), 100 мкМ (синяя линия) и 1000 мкМ (красная линия). Рассчитанные степени олигомеризации указаны в скобках.

При низкой концентрации аптамера Т4Т4 (10 мкМ) димер не образуется. Имеется единственный пик с $v_R / v_0 = 1,56$ (степень олигомеризации 0,9),

соответствующий мономеру. Интересно отметить, что у нековалентного димера T4T4 плечо на пике мономера наблюдалось точно так же, как и для G-квадруплексов HD1 и RA-36. Когда концентрация сборки аптамера T4T4 была увеличена в 10 раз, до 100 мкМ, наблюдались два пика. Помимо основного пика, который соответствует мономеру с тем же $v_R / v_0 = 1,56$ (степени олигомеризации 1,0), появился второй пик (4%) димера с $v_R / v_0 = 1,35$ (степени олигомеризации 2,0). При концентрации сборки аптамера T4T4 (1000 мкМ) выход димера увеличивался до 50% (степени олигомеризации 1,0 – соответствует мономеру, 2,0 – соответствует димеру аптамера). Таким образом, димеризация T4T4 происходит концентрационно зависимо (Рис. 15).

При разбавлении нековалентного димера T4T4 (Рис.16) от 1 мМ до



10 мкМ наблюдается образование более крупных олигомеров. Разбавление проводили в подвижной фазе 1.

Рисунок 16. Влияние разбавления на олигомерный состав конструкции с межмолекулярным G-квадруплексов. Димерная конструкция с межмолекулярным G-квадруплексом (T4T4) была собрана при концентрации 1 мМ в буфере buf1.10К и разбавлена до 10 мкМ, имеющийся в подвижной фазе 1. Рассчитанная степень олигомеризации указана в скобках.

2.1.1.2.2. Оптимизация условий эксклюзионной хроматографии.

Высокое содержание соли необходимо для эффективного разделения с помощью эксклюзионной хроматографии; но состав буфера может влиять на выход межмолекулярных G-квадруплексов (Рис. 17).

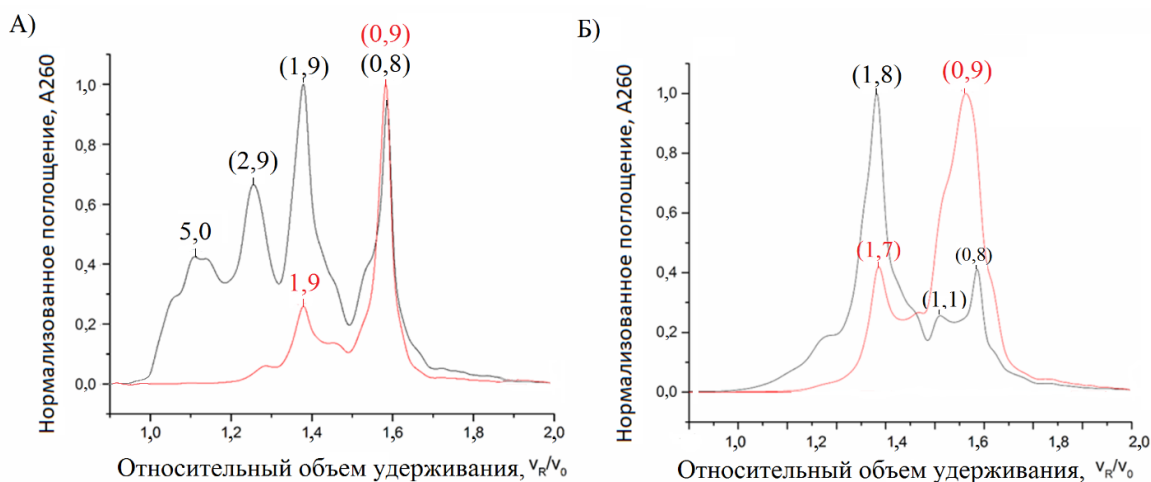


Рисунок 17. Влияние буфера для сборки на олигомерный состав аптамеров. Аптамеры T4TG (А) и T4TTGTT (Б) в двух разных буферах: buf1.10К (20 мМ фосфат натрия, 10 мМ КСl, 140 мМ NaCl; (черная линия)) и buf5.340К (60 мМ KH_2PO_4 и 140 мМ K_2HPO_4 ; (красная линия)). Рассчитанные степени олигомеризации указаны в скобках.

Конструкции собирали в буферах с низким содержанием K^+ (buf1.10К, Рис. 17А,Б; черная линия) и буферах с высоким содержанием K^+ (buf5.340К, Рис. 17А,Б; красная линия). Количество олигомеров снижалось при высокой концентрации K^+ и высокой ионной силе за счет стабилизации внутримолекулярных G-квадруплексов. Таким образом, необходима замена подвижной фазы в хроматографии с системы с высоким K^+ на систему с низким K^+ с сохранением ионной силы буфера для исключения влияния буфера, используемого во время разделения, на олигомерный состав.

Для оптимизации состава подвижной фазы аптамер Т4Т4 с межмолекулярным G-квадруплексом был собран в четырех буферах (Рис. 18).

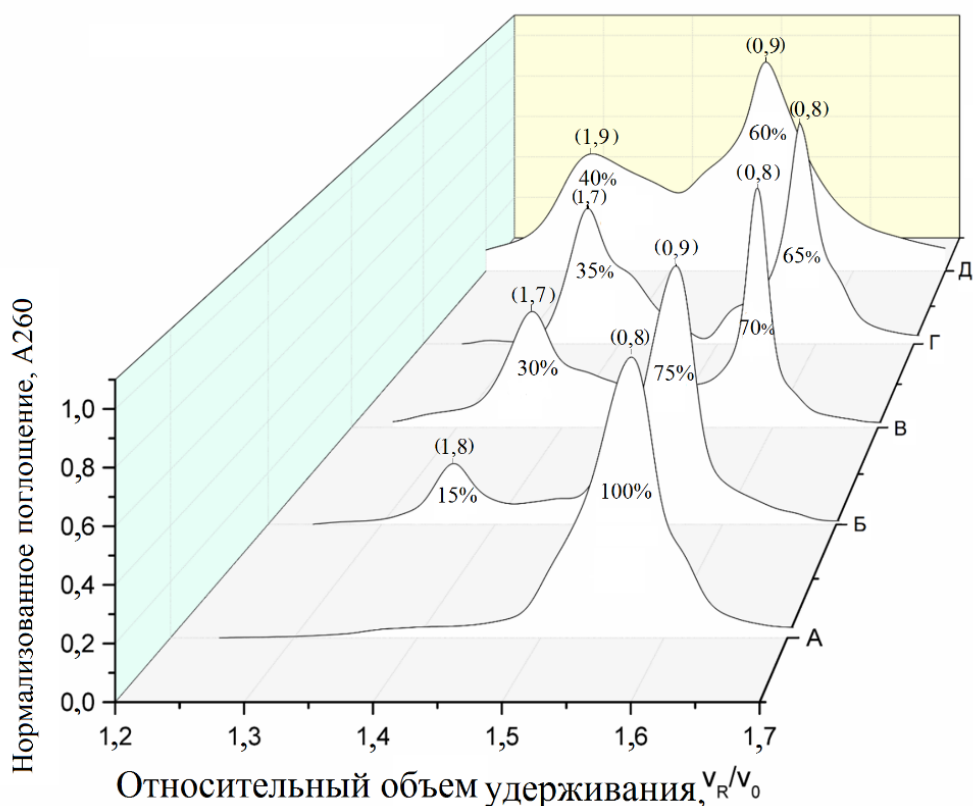


Рисунок 18. Сравнение выхода димерной конструкции Т4Т4, собранной в различных буферах и подвижных фазах: в подвижной фазе 1 с высокой концентрацией K^+ , А – 160 мМ Na_2HPO_4 , 20 мМ KH_2PO_4 ; Б – 60 мМ KH_2PO_4 , 140 мМ K_2HPO_4 ; В – 20 мМ Трис·HCl, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl; Г – 160 мМ Na_2SO_4 , 20 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.

В натрий-фосфатном буфере с 20 мМ K^+ пик димера не наблюдался (Рис. 18А); низкое содержание димерной конструкции наблюдалось в калий-фосфатном буфере (Рис. 18Б). Два других буфера обеспечивали значительный выход димера Т4Т4, а именно 30-35%. Один из буферов содержал хлорид натрия в качестве основного солевого компонента (Рис.

18В), другой сульфат натрия в качестве основного компонента (Рис. 18Г). Эти результаты показывают, что выход димера Т4Т4 значительно снижается при высокой концентрации фосфат-аниона. Подвижная фаза ВЭЖХ была заменена на 6,7 мМ KH_2PO_4 , 13,3 мМ K_2HPO_4 и 160 мМ Na_2SO_4 . 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.

Еще одна важная проблема - эффект разбавления образца во время разделения методом ВЭЖХ, который может сдвинуть равновесие в сторону мономерных форм, что приведет к искаженным результатам. Был проведен следующий эксперимент. Т4Т4 собирали в концентрации 1 мМ в buf1.10К, разбавляли в подвижной фазе ВЭЖХ с высоким содержанием K^+ (buf5.340К + 10% ацетонитрил) до 10 мкМ и анализировали с помощью ВЭЖХ через 1 час после разбавления с использованием в том же буфере и подвижной фазе. Разбавление вызвало перестройку G-квадруплексов из смеси димерных и мономерных конструкций в 1 мМ растворе в смесь с дополнительными олигомерными структурами (Рис 16). Димеры медленно диссоциируют после разбавления, и высокое содержание катионов калия в подвижной фазе смещает равновесие в сторону три- и тетрамерных частиц. Таким образом, условия ВЭЖХ действительно влияют на равновесие между формами G-квадруплекса, необходим тщательный подбор условий для конкретного объекта.

2.1.1.2.3. Димерные конструкции с межмолекулярным дуплексом

Для димеризации аптамера с помощью дуплекса к аптамерному модулю HD1 с одноцепочечным фрагментом из 14 нуклеотидов (аптамер HD1-TT-14ss, Рис. 19Б, красная линия) добавили аптамерный модуль HD1 с комплементарной последовательностью к одноцепочечному фрагменту (HD1-c14ss). Таким образом, был получен димер аптамера с дуплексным «замком» dHD1-14ds.

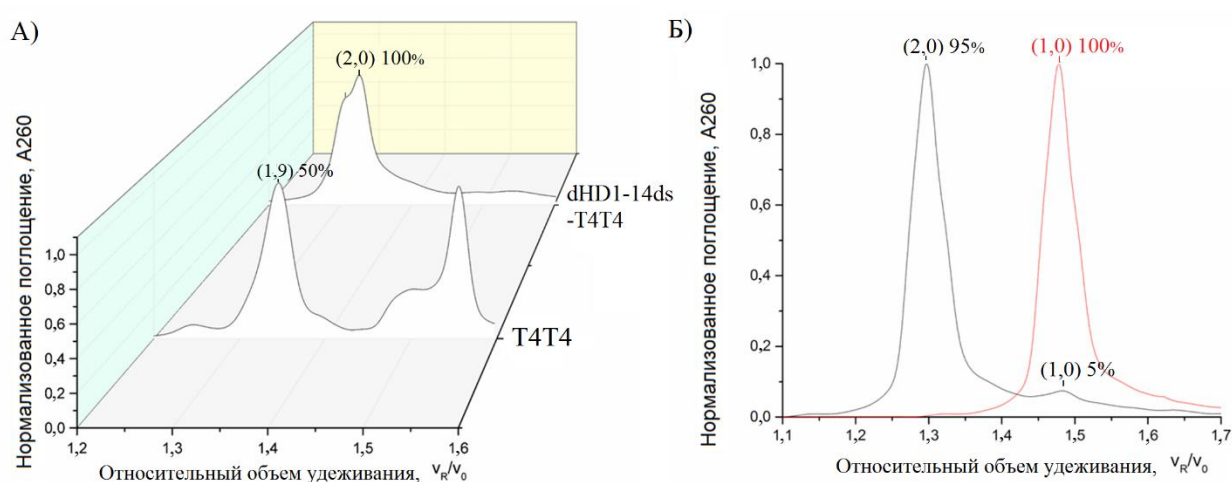


Рисунок 19. Сравнение сборки межмолекулярных конструкций. А: сравнение сборки конструкций с межмолекулярным дуплексом (dHD1-ds-T4T4) и G-квадруплексом (Т4Т4); Б: мономеры HD1-TT-14ss и HD1-TT-c14ss (красная линия) и димерная конструкция dHD1-14ds с межмолекулярным дуплексом (черная линия). Рассчитанные степени олигомеризации указаны в скобках.

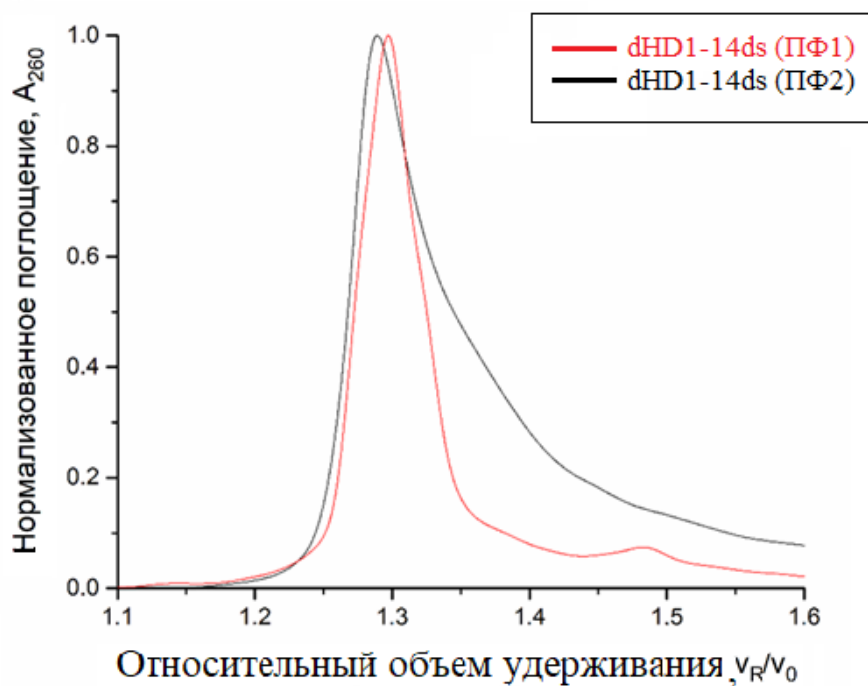


Рисунок 20. Сравнение сборки димерных конструкций dHD1-14ds с межмолекулярным дуплексом в разных подвижных фазах: красная линия - с высоким K^+ (ПФ1), черная линия - с низким K^+ (ПФ2).

2.1.1.2.4. Оптимизация сборки конструкций при нековалентной димеризации

Димеризация нековалентного G-квадруплексного аптамера GL2-HD1 (T4T4) может быть оптимизирована за счет изменения петель и линкеров межмолекулярного G-квадруплекса. Наблюдалось увеличение выхода димера с 40% до 50% при укорочении линкера между HD1 и межмолекулярным G-квадруплексом до трех тиминов (аптамер T3T4) (Рис. 21А).

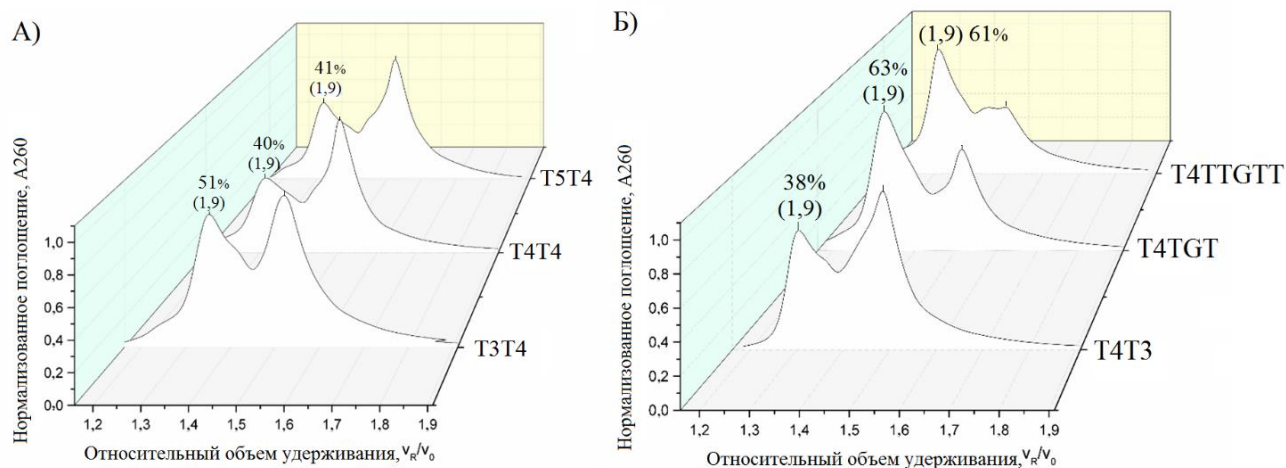


Рисунок 21. Влияние длины линкера (А) (конструкции Т3Т4, Т4Т4, Т5Т4) и структуры петли (Б) (конструкции Т4Т3, Т4ТТГТТ, Т4ТГТ) в межмолекулярном G-квадруплексе на выход димерной конструкции.

Последовательность петли в межмолекулярном G-квадруплексе имеет более выраженный эффект. Межмолекулярные G-квадруплексы с петлями TGT и TTGTT имели выход димера 60%, что в 1,5 раза больше по сравнению с 40% для аптамера T4T4 с петлей TTTT (Рис. 21Б).

Образование межмолекулярного дуплекса происходит с большим выходом, чем образование межмолекулярного G-квадруплекса. Сборка димерных конструкций с межмолекулярным дуплексом дает преимущественно димер в случае dHD1-14ds-T4T4 и dHD1-14ds (Рис. 20А). В отличие от межмолекулярного G-квадруплекса, сборка происходит при концентрации 100 мкМ.

Таблица 5. Оценка выхода димерных конструкций на основе аптамера HD1.

Аптамер	Мономер (%)	Димер (%)	Тип межмолекулярной конструкции
HD1	100	0	Нет
T3T4	49	51	G-квадруплекс
T4T4	60	40	G-квадруплекс
T5T4	59	41	G-квадруплекс
T4TGT	37	63	G-квадруплекс
T4TTGTT	39	61	G-квадруплекс
T4T3	62	38	G-квадруплекс
HD1-TT-14ss	100	0	Нет
HD1-TT-c14ss	100	0	Нет
dHD1-14ds	0	100	Дуплекс
c-T4T4	100	0	нет
HD1-c-T4T4	100	0	нет
dHD1-14ds-T4T4	0	100	Дуплекс

2.1.2. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Конструкции димерных аптамеров T4T4 и dHD1-14ds исследованы спектроскопией кругового дихроизма (КД), УФ и ¹H ЯМР. ¹H ЯМР позволил отличить иминопротоны дуплекса ДНК от G-квадруплекса HD1 и межмолекулярного G-квадруплекса (Рис. 22).

Спектр ¹H ЯМР 1 мМ раствора T4T4, димеризованного за счет межмолекулярного G-квадруплекса содержал набор пиков G-квадруплекса при 11-11,8 м.д. (Рис. 22А).

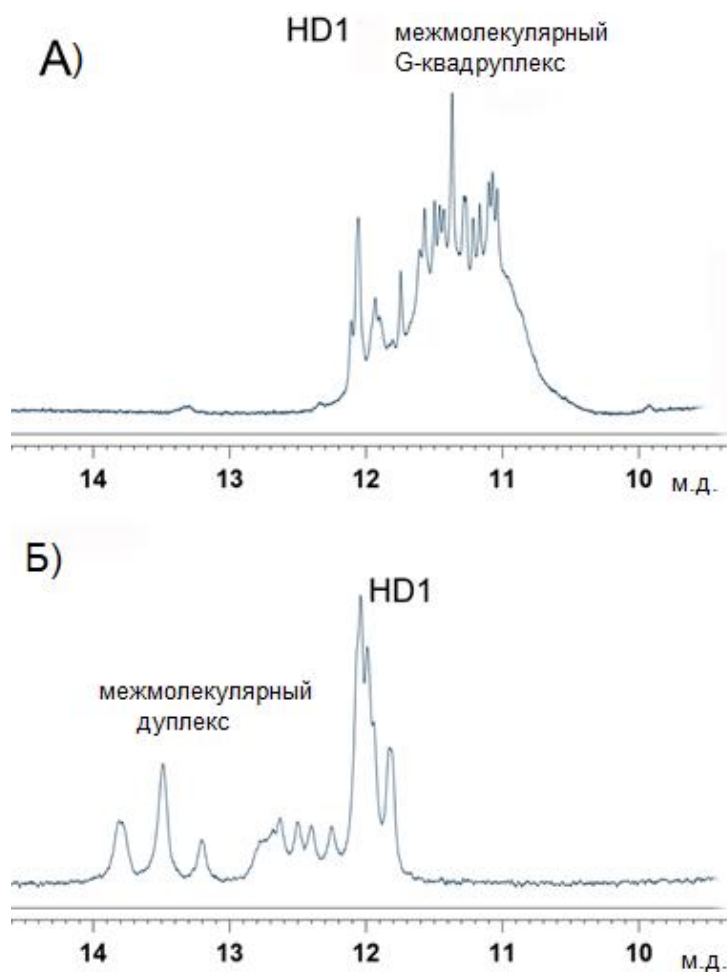


Рисунок 22. Спектры ^1H ЯМР димерных аптамеров с межмолекулярным А) G-квадруплексом (1 мМ раствор Т4Т4) и Б) дуплексом (670 мкМ раствор dHD1-14ds).

Сигналы ^1H перекрываются, но их расчетное количество составило 16 ядер в полном соответствии с 16 гуанинами в межмолекулярном G-квадруплексе димерной конструкции (Рис. 22А). 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 $\text{G}_{3-4}\text{T}_{3-4}\text{G}_{3-4}$ 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. 22Б), что подтверждает сосуществование аптамерного модуля и межмолекулярного дуплекса.

2.1.3. Оценка топологии G-квадруплексов и термической стабильности димерных конструкций

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 [2] (Рис 11, Рис. 23).

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. Кривые плавления dHD1-14ds также содержат зависимое от температуры увеличение поглощения при 260 нм, что характерно для ДНК-дуплексов. Димерный аптамер с межмолекулярным дуплексом (dHD1-14ds) помимо положительного максимума при 295 нм содержал отрицательный максимум при 245 нм, характерный для ДНК-дуплексов (Рис. 24Б) [125, 29].

Димерный аптамер с межмолекулярным G-квадруплексом (T4T4) в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ имеет спектры КД с экстремумами, характерными для антипараллельного G-квадруплекса. T4T4 не имел выраженного отрицательного максимума в области 240-265 нм, что можно было бы интерпретировать как несколько сосуществующих топологий G-квадруплексов или некоторые искажения в структурах G-квадруплексов. Структура T4T4 слишком сложна, чтобы ее можно было однозначно интерпретировать с помощью данного метода.

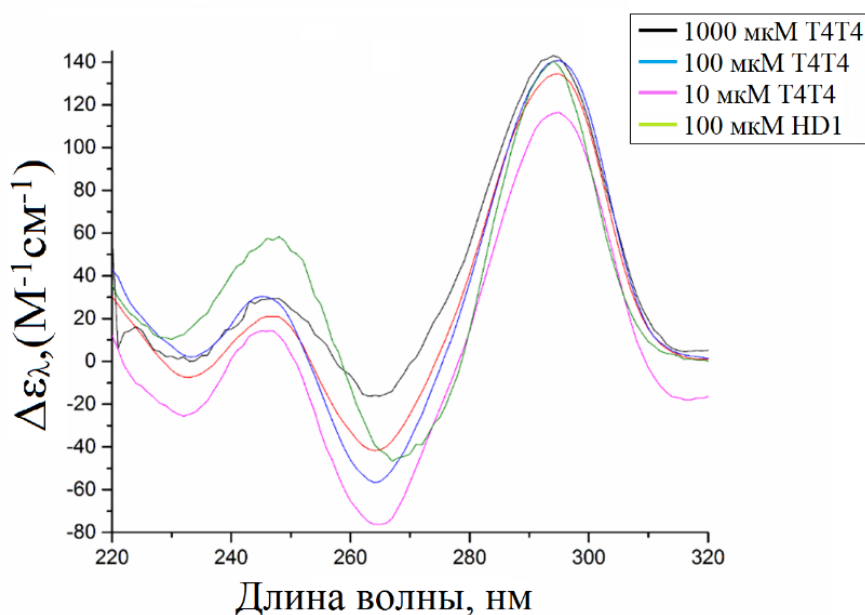


Рисунок 23. Спектры КД димерной конструкции T4T4 с межмолекулярным G-квадруплексом при разных концентрациях сборки аптамера, а также спектр мономерного аптамера HD1.

Изменения УФ-спектра при термическом плавлении могут быть использованы для подтверждения интерпретации спектров КД [29]. УФ-спектры как T4T4, так и dHD1-14ds (Рис. 24 В, Г) имеют зависимое от температуры уменьшение поглощения при 295 нм, что характерно для антипараллельных G-квадруплексов [29]. УФ-спектры dHD1-14ds имеют зависящее от температуры увеличение поглощения при 260 нм, характерное для двуцепочечной ДНК [29].

Температурные изменения кривых КД и УФ (Рис. 24) были использованы для оценки температур плавления G-квадруплексов и дуплексных модулей.

Модуль HD1 в dHD1-14ds имел температуру плавления 33°C, что на 5°C ниже, чем у аптамера HD1. При этом дуплексный модуль устойчив и имеет температуру плавления 62,1°C. Температура плавления T4T4 близка к таковой для HD1 (Табл. 6). Эксперименты КД и УФ-спектроскопии подтвердили сосуществование дуплексных и G-квадруплексных модулей в dHD1-14ds.

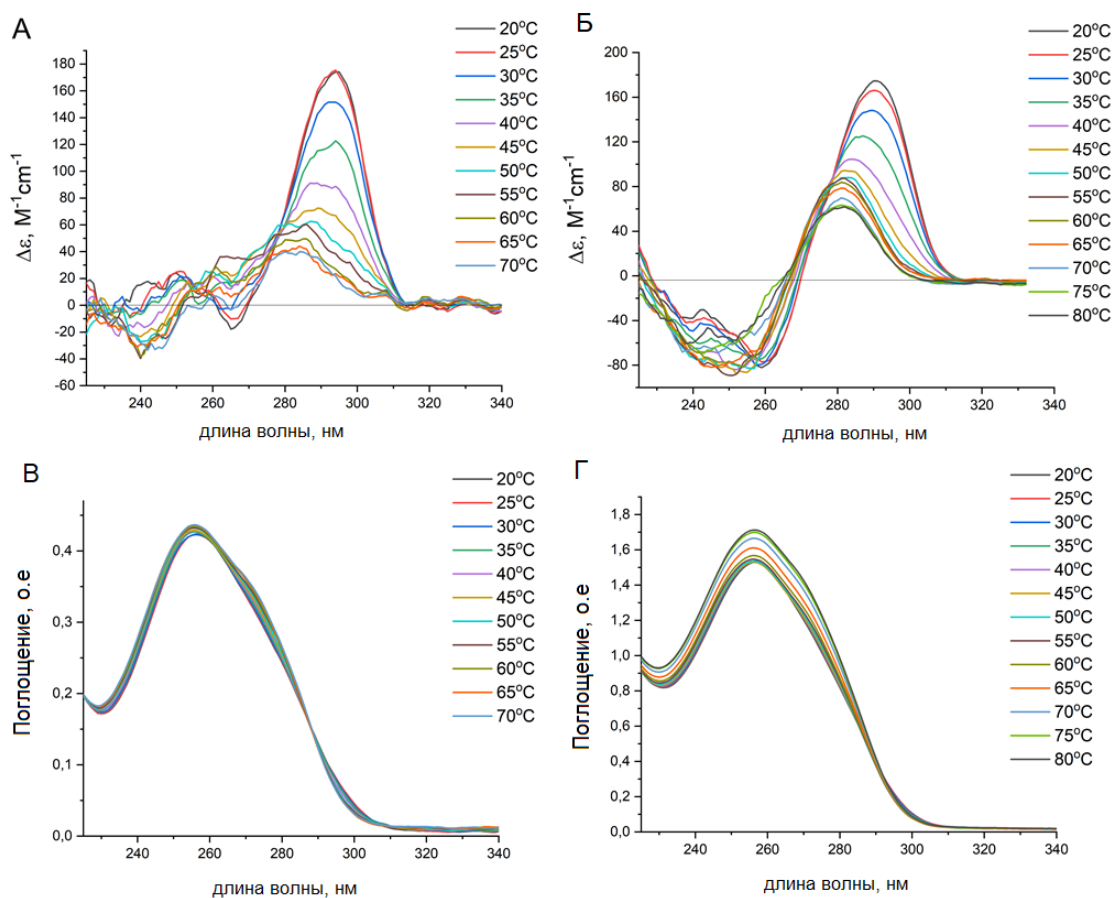


Рисунок 24. Спектры кругового дихроизма (А, Б) и УФ (В, Г) димерных аптамеров с межмолекулярным G-квадруплексом (сборка при 1 мМ раствор Т4Т4 - А, В) и дуплексом (сборка при 100 мкМ dHD1-14ds - Б, Г), полученные при разных температурах.

Таблица 6. Сравнение термической стабильности модулей в наноконструкциях. Температуры плавления ($T_{пл}$) были рассчитаны для поглощений при длинах волн 260 нм и 295 нм.

Аптамеры	$T_{пл}$ (КД), °С		$T_{пл}$ (УФ), °С	
	295 нм	260 нм	295 нм	260 нм
Т4Т4	35,6±0,7	нет	37,7±1,3	нет
dHD1-14ds	33,0±0,5	62,1±0,2	32,8±0,3	нет
HD1	38,8±0,2	нет	38,0±1,0	нет

2.1.4. Оценка функциональной активности димерных аптамеров к тромбину

Ингибирующую активность модуля HD1 оценивали с помощью коагуляционного теста. Тест тромбинового времени заключается в добавлении тромбина в плазму крови человека. Когда аптамер с модулем HD1 связывается с тромбином, свертывание плазмы крови замедляется (Рис. 25).

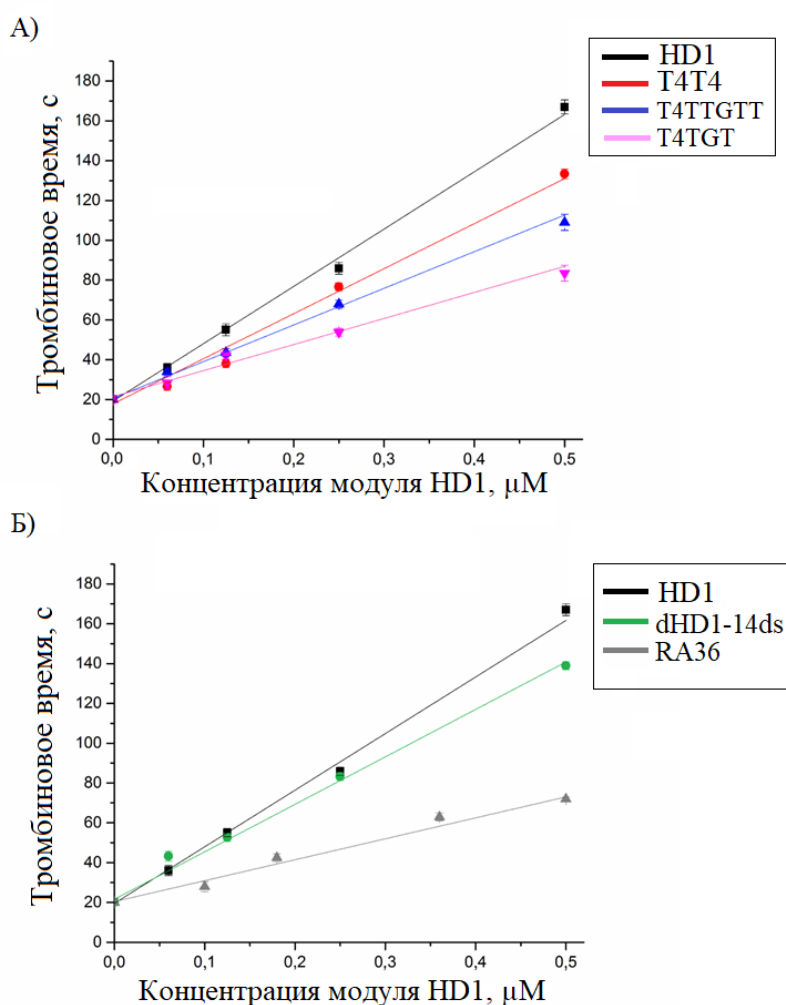


Рисунок 25. Сравнение ингибирующей активности димерных аптамеров (А) с межмолекулярным G-квадруплексом – HD1 (черный), T4T4 (красный), T4TTGTT (синий), T4TGT (розовый); (Б) с межмолекулярным дуплексом и ковалентной сшивкой через тиминный линкер – HD1 (черный), dHD1-14ds (зеленый), RA-36 (серый).

Концентрация сборки аптамеров составляла 1000 мкМ.

Конструкция Т4Т4 обладала наибольшей ингибирующей активностью среди димерных конструкций с межмолекулярным G-квадруплексом (Рис. 25А). Его активность на 15% уступает активности аптамера HD1. Аналогичный результат был получен для конструкции dHD1-14ds с межмолекулярным дуплексом (Рис. 25Б). И Т4Т4, и dHD1-14ds обладали гораздо более высокой ингибирующей активностью, чем ковалентный димер с коротким линкером, аптамер RA-36 (функциональная активность RA-36 на 50% уступает активности аптамера HD1) [29]. 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.

2.1.5. Оценка аффинности димерных аптамеров к тромбину

Аффинность димерных аптамеров к тромбину оценивали с помощью метода интерферометрии биослоев, который позволяет определять кинетические параметры образования комплексов белка 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) (Рис26, Табл 7).

Мономерный аптамер HD1 имел самое низкое сродство ($K_d = 2,6$ нМ). Во всех случаях димерные аптамеры имели гораздо более низкие скорости диссоциации, чем мономерные аптамеры (Табл. 7, Рис. 26), что можно объяснить кооперативным связыванием конструкций с двумя соседними иммобилизованными молекулами тромбина.

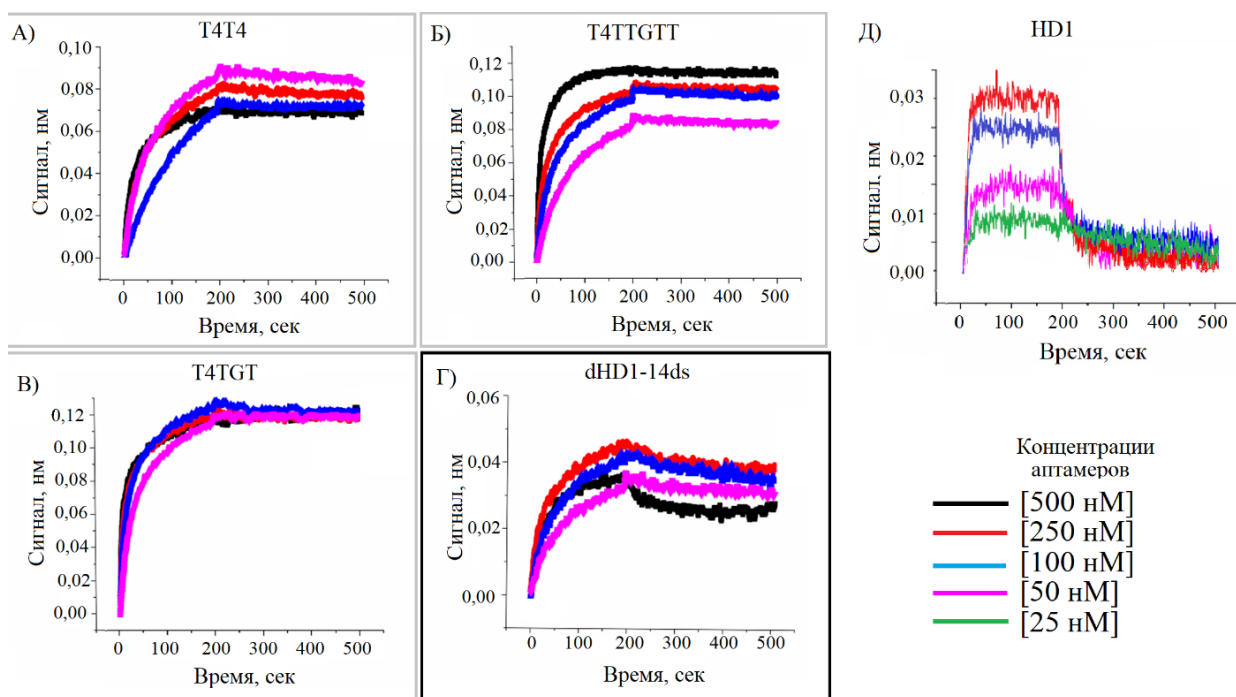


Рисунок 26. Сенсограммы аффинности комплекса димеров аптамеров с тромбином. А, Б, В – димеры, образованные с помощью G-квадруплексного «замка» T4T4, T4TGT, T4TTGTT; Г – димер, образованный с помощью дуплексного «замка» dHD1-14ds; Д- исходный мономерный аптамер HD1.

Таблица 7. 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

2.2. Димеры аптамеров к EGFR

Димеризация EGFR – один из первых этапов запуска каскада фосфокиназ. В данной работе предлагается 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) и РНК-аптамера к EGFR mE07, (конструкция 2).

Конструкция 1 (Димер ДНК-аптамера GR20, dGR20-20ds)

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. 9). На 5'-конце одного из аптамеров (GR20-ТТ-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. 11В).

Конструкция 2 (Димер РНК-аптамера mE07, dmE07-24ds)

Синтезированы два РНК-аптамера mE07, которые имеют на 3'-конце дополнительные участки, которые взаимокomплементарны. 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-c24ss) флуоресцентная метка отсутствовала. При смешивании и отжиге первого аптамера (mE07-UU-24ss) со вторым (mE07-UU-c24ss) дополнительные участки из 24-х нуклеотидов гибридизуются с образованием димерного аптамера (dmE07-24ds).

Конструкция 3 (мономерный РНК-аптамер mE07 с межмолекулярным дуплексом на 3'конце, mE07-24ds)

Также была собрана конструкция мономерного РНК-аптамера mE07 с дуплексом из 24 п.о. на 3'-конце. Комплементарный олигонуклеотид имел в 5'-конце флуоресцентную метку ФАМ. При смешивании и отжиге аптамера (mE07-UU-24ss) с ДНК-комплементарной последовательностью (c-24ss) дополнительные участки из 24-х нуклеотидов гибридизуются с образованием дуплекса (mE07-24ds).

2.2.1. Оценка термической стабильности межмолекулярных дуплексов

Межмолекулярный дуплекс из 20-ти и 24-х пар оснований собирали из комплементарных олигонуклеотидов 20-ss с 20-c-ss и 24-ss с 24-c-ss при концентрации 2 мкМ в буфере 20 мМ Трис·HCl, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂ (pH 7,0).

По данным УФ-спектрофотометрии температура плавления дуплекса из 20-ти пар оснований составила 62°C, а дуплекса из 24-ти пар оснований – 75°C. Выбранные дуплексы устойчивы при физиологических условиях.

2.2.2. Оценка сборки димерной конструкции

Выход димера оценивали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Собирали три конструкции: конструкция 1 (димер ДНК-аптамера), конструкция 2 (димер РНК-аптамеры), конструкция 3.

Конструкции (1, 2, 3) собирали при концентрации 2 мкМ в буфере 20 мМ Трис·НСl, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂ при pH 7,0, и отжигали 5 мин при температуре 95°C перед экспериментом.

По данным эксклюзионной хроматографии как димер ДНК-аптамера (конструкция 1), так и димер РНК-аптамера (конструкция 2) собираются с выходом около 80% (Рис.27).

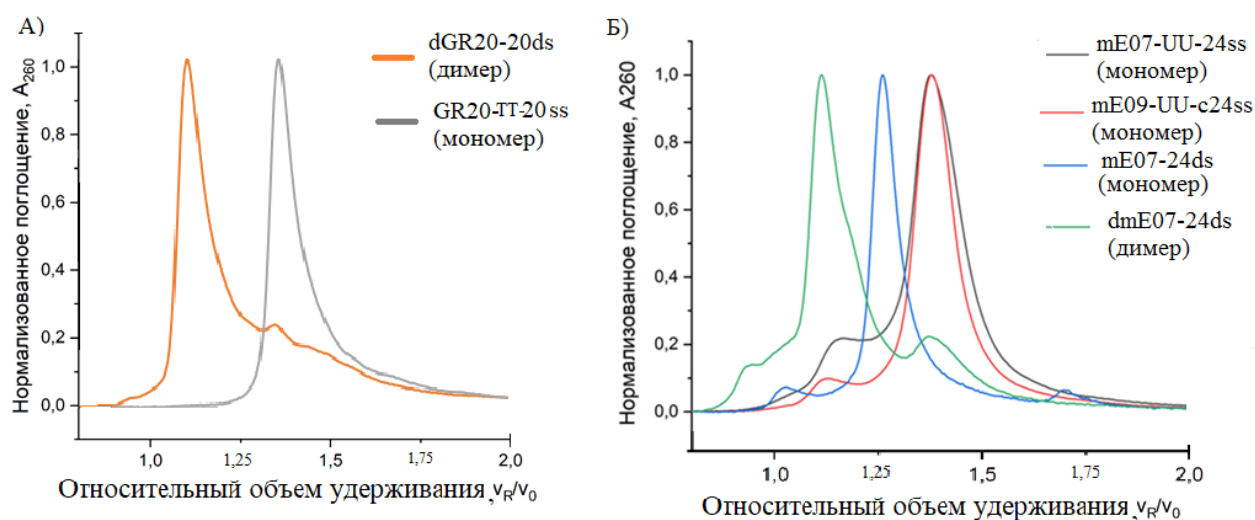


Рисунок 27. Оценка выхода конструкций ДНК- (А) и РНК- (Б) аптамеров к EGFR. А: Серая линия – мономерный GR20-TT-20ss, оранжевая линия – dGR20-20ds – димерный аптамер с межмолекулярным дуплексом. Б: Серая линия – mE07-UU-24ss – мономер аптамера с одноцепочным (оц.) РНК-«хвостом», красная линия – mE07-UU-c24ss – 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».

Наблюдается небольшое количество мономерной фракции (20%). (Рис.27). Конструкция 3 собирается с выходом 95%. Таким образом, димерные конструкции получены с высокими выходами.

2.2.3. Связывание мономерных и димерных аптамеров к EGFR с клетками линии A431

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

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

Для того чтобы определить сродство аптамера при взаимодействии с клетками A431 использовали серию флуоресцентно-меченых ДНК-аптамеров: U31 (аптамер-предшественник GR20, 76 нуклеотидов), мономерный аптамер GR20 (46 нуклеотидов) и димер dGR20-20ds (136 нуклеотидов), и РНК-аптамеров: mE07 (46 нуклеотидов) и его димером dmE07-24ds (144 нуклеотида). В качестве контроля приведены данные для клеток линии A431 без аптамеров.

Аптамеры в опытах 4 и 5 (Рис. 28) были преформированы в концентрации 100 мкМ в буфере 20 мМ Трис·НСl, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ путем отжига в течение 5 минут при температуре 95°C с последующим охлаждением при комнатной температуре. Для оценки необходимости процедуры преформирования, в опыте 3 (Рис. 28) аптамер GR20 не был преформирован. Далее аптамеры U31 и GR20 были разведены до 2 мкМ и добавлены к клеткам линии A431. Показано, что оба мономерных ДНК-аптамера, U31 и GR20, связываются с клетками линии A431. В отсутствие преформирования аптамера GR20, интенсивность флуоресценции клеток снижалась в 1,4 раза, что указывает

на необходимость этапа преформирования для сборки конформации аптамера (Рис.28 3,4).

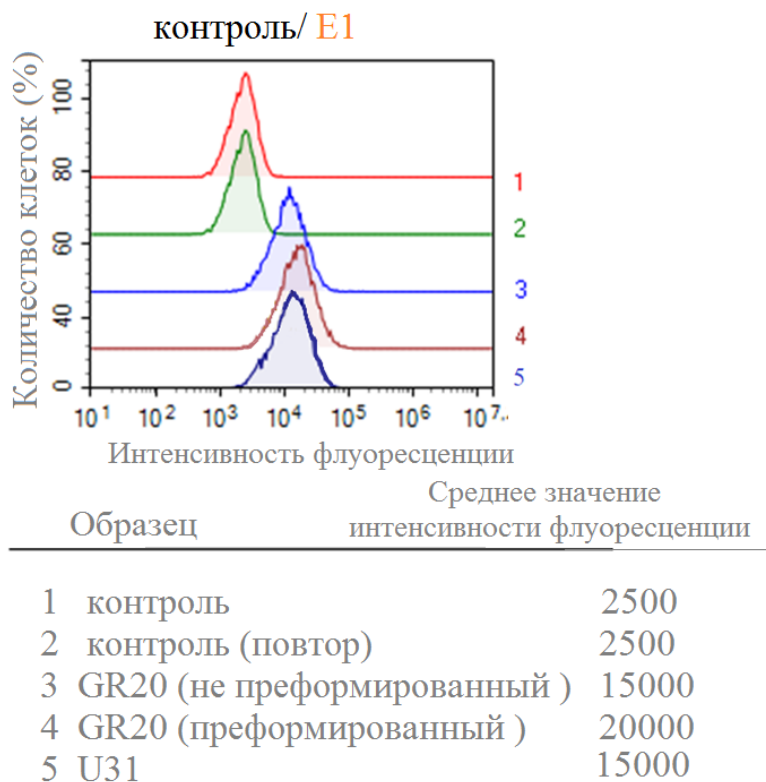


Рисунок 28. Оценка связывания мономерных аптамеров к EGFR с клетками линии A431 по данным проточной цитофлуорометрии. Конечная концентрация аптамеров GR20 и U31 – 2 мкМ, а димера dGR20-20ds 1мкМ.

Далее был исследован димер dGR20-20ds в сравнении с мономерным GR20. Димер был собран при концентрации 2 мкМ в буфере 20 мМ Трис·НСl, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂. Эксперимент по проточной цитофлуорометрии показал, что нет значимых отличий между связыванием мономера и димера аптамера GR20 с клетками линии A431 (Рис.29А).

Аналогичный опыт с РНК-аптамерами показал, что наибольшим сродством к клеткам линии A431 обладает исходный аптамер mE07 (Рис.29Б,В).

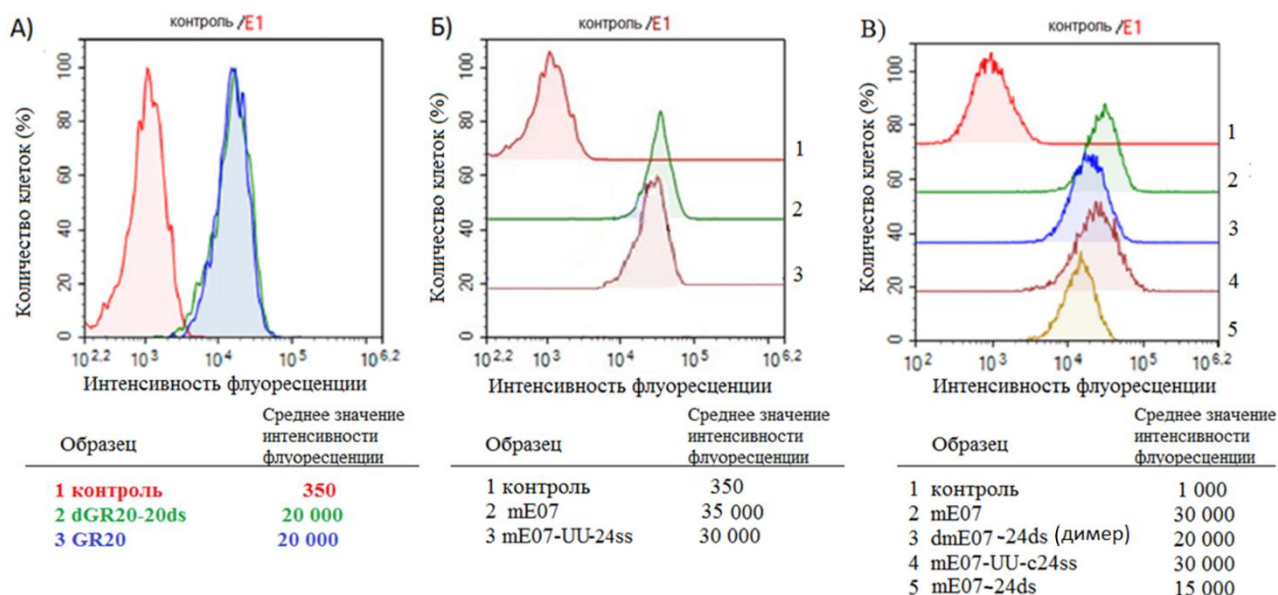


Рисунок 29. Клетки линии A431, флуоресцентно меченные (А) ДНК- и (Б,В) РНК-аптамерами по данным проточной цитофлуориметрии. **А:** Исходные клетки – красным цветом, клетки после взаимодействия с мономерным ДНК-аптамером GR20 – синим, клетки после взаимодействия с димерной конструкцией dGR20-20ds – зеленым; **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).

Добавление дополнительных последовательностей, дуплексов, при димеризации РНК-аптамера сохраняют способность аптамера

связываться с клетками, однако, интенсивность флуоресценции снижается. Что указывает на снижение сродства к клеткам.

Таким образом, предложенные димерные конструкции сохраняют сродство к клеткам линии A431. В сравнении с мономерными аптамерами, сродство димера dGR20-20ds неизменно, а сродство димера dmE07-24ds снижено в 1.5 раза.

2.2.4. Локализация аптамеров к EGFR в клетках линии A431

Локализацию аптамеров исследовали методом конфокальной микроскопии.

5'-ФАМ-меченые аптамеры U31, GR20 и dGR20-20ds инкубировали с клетками линии A431 3 часа при 37°C. Ядра клеток окрашивали раствором бисбензимида.

По данным конфокальной микроскопии, аптамеры не только взаимодействуют мембраной клеток линии A431, но и частично проникают в ядра клеток (Рис.30). Наибольшая эффективность проникновения в ядро наблюдалась у димерной конструкции dGR20-20ds (Рис. 30В). Для мономерных аптамеров U31 и GR20 также наблюдается проникновение в ядра клеток (Рис.30А,Б), но по сравнению с димерной конструкцией оно меньше. Наименьшее количество окрашенных аптамером ядер наблюдалось в случае аптамера GR20. Эти результаты могут косвенно указывать на оптимизацию конструкции и ее EGFR-зависимое проникновение в ядра.

Конструкции 2 и 3

Аналогичные эксперименты с РНК-аптамером mE07 и его димером dmE07-24ds показали, что в отличие от ДНК-аптамеров к EGFR, РНК-аптамеры не локализованы в ядрах (Рис. 31А,Б). Данные конфокальной микроскопии приведены на Рис. 31, ядра клеток окрашены бисбензимидом. В качестве положительного контроля использовали аптамер U31, а в качестве

отрицательного – клеточную линию A431 без аптамеров. Локализация димерной конструкции не определена, показано, что нет проникновения в ядра клеток.

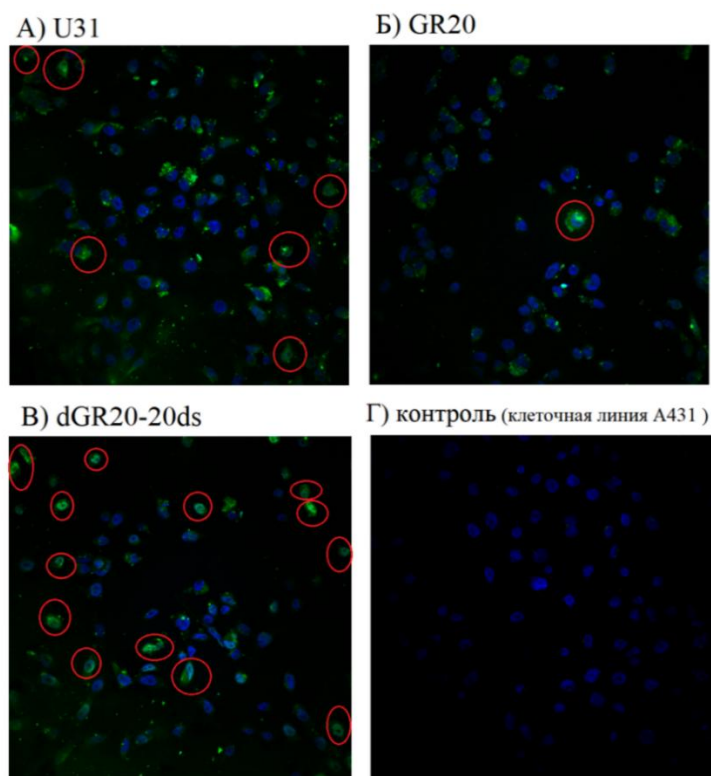


Рисунок 30. Конфокальная микроскопия клеток линии A431, обработанных ФАМ-мечеными аптамерами: U31 (А), GR20 (Б), dGR20-20ds (В); клетки без олигонуклеотидов (Г). Синий цвет – ядра клеток A431, окрашенные бисбензими́дом. Зеленый цвет – локализация аптамеров с ФАМ-меткой.

Эндоцитоз – процесс, задействованный в передаче сигналов в клетку, поскольку таким образом контролируется количество рецепторов, доступных для активации в плазматической мембране. С другой стороны, активация рецепторов часто стимулирует их эндоцитоз. Связывание лиганда и активация тирозинкиназного домена приводит к быстрому эндоцитозу EGFR [127].

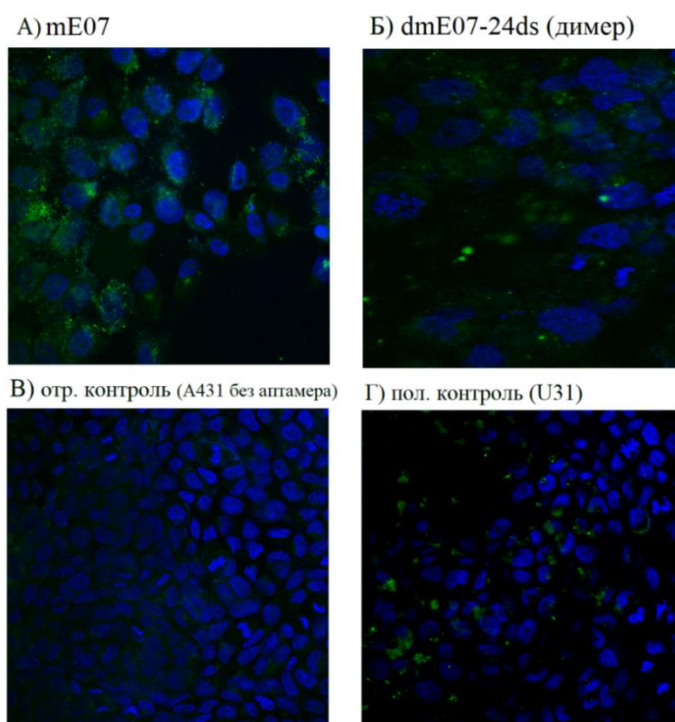


Рисунок 31. Конфокальная микроскопия клеток линии A431, обработанные ФАМ-мечеными мономерным РНК-аптамером mE07 (А), димерной конструкцией dmE07-24ds (Б). Контроли: клетки, не обработанные аптамерами (В), и клетки, обработанные ДНК-аптамером U31 (Г). Синий цвет – ядра клеток, окрашенные бисбензимидам. Зеленый цвет – локализация аптамеров с ФАМ-меткой.

По нашим данным по взаимодействию 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.28Б,В). Транспорт EGFR из плазматической мембраны в ядро происходит посредством эндоцитоза. Из данных литературы известно, что меченый EGF перемещается вместе с рецептором в ядро, и что фосфорилированный EGFR можно обнаружить в ядре в течение 5 минут после стимуляции EGF с достижением максимальной концентрации в течение 10 минут [128]. Исходя из этих данных можно сделать вывод, что димерные аптамеры узнают рецептор (предположительно, в димерной форме) и

интернализуются в ядро. Димер РНК-аптамера (dmE07-24ds) и исходный РНК-аптамер mE07 не проникают в ядра клеток линии A431 (Рис. 29). Таким образом, этот эффект зависит от сайта связывания аптамера на поверхности EGFR.

С помощью конфокальной микроскопии получены данные для аптамера mE07-UU-c24ss, который был использован в качестве компонента при димеризации аптамера (Рис. 30). Этот аптамер состоит из модуля mE07 и хвоста из РНК-последовательности, соединенных линкером из двух урацилов. По этим данным можно предположить, что mE07-UU-c24ss может находиться как в нуклеоплазме, так и в ядерной мембране, поскольку происходит окрашивание субструктур ядра. По данным литературы известно, что EGFR может быть обнаружен в нуклеоплазме, так и во внутренней ядерной мембране [128]. На Рис.30 красным цветом выделены клетки, в которых аптамер окрашивает ядро полностью, а желтым цветом – клетки, в которых наблюдается окрашивание субструктур ядра, а именно, ядрышек. Интересно, что собранная димерная конструкция не окрашивает ядра и ядрышки. Т.о. конструкции работают неаддитивно, эффект от конструкции не равен сумме эффектов от компонентов.

Интернализированный EGFR также может транспортироваться в аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум и митохондрии, помимо ядра. Механизм транспорта EGFR в ядра, остается не до конца ясными до настоящего момента, возможно, что EGFR оказывается в ядре несколькими путями [127, 128].

Ядерный EGFR может представлять собой прогностический показатель плохого клинического исхода, из-за возможности ядерного EGFR контролировать физиологические процессы, способствующие развитию агрессивной формы раковой опухоли. В нескольких исследованиях, опубликованных в литературе, сообщается, что лучевая терапия индуцирует ядерную транслокацию EGFR [129]. В ядре EGFR

образует комплексы с ДНК и стабилизирует ее, что приводит к восстановлению двуспиральных ДНК.

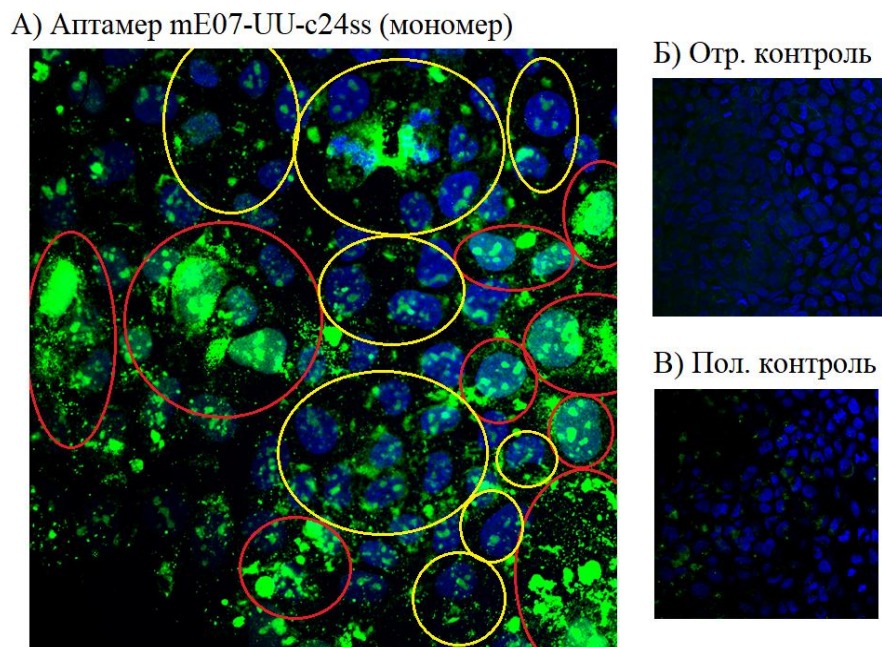


Рисунок 32. Конфокальная микроскопия клеток линии A431, обработанные ФАМ-мечеными мономерным РНК-аптамером mE07-UU-c24ss. Отрицательный контроль: клетки A431 без аптамера (Б), положительный контроль ДНК-аптамер U31 (В). Синий цвет – ядра клеток, окрашенные бисбензимином. Зеленый цвет – ФАМ-метка, конъюгированная с аптамером. Красным цветом выделены клетки, в которых аптамер окрасил ядро и околоядерные структуры полностью, желтым цветом выделены клетки, в которых наблюдается окрашивание аптамером ядрышек.

Корреляция ядерной экспрессии EGFR с плохой выживаемостью пациентов при некоторых видах рака, его связь с устойчивостью к различным видам лечения, участие в регуляции генов, необходимых для клеточной пролиферации, свидетельствует о том, что ядерная локализация EGFR вовлечена в этиологию рака и обеспечивает основу для разработки новых методов лечения для клинического воздействия на этот способ передачи сигналов в будущем.

2.2.5. Исследование выживаемости клеток линии A431 в присутствии 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 8. Влияние аптамеров на выживаемость клеток линии A431. В скобках указаны концентрации аптамеров в эксперименте. Приведены абсолютные значения, полученные в МТС-тесте, и относительные значения, нормированные на контроль. Контроль – 100%.

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

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Реактивы и биопрепараты

Неорганические соли от марки ChemMed (Россия), кроме NaCl, MgCl₂ от Merck (Германия) и KCl от Serva (Германия); Пероксодисульфат аммония (PSA, Panreac / Applichem, Германия), ТЕМЕД (Isnbiomed, Германия), ЭДТА (Panreac / Applichem, Германия), акриламид (Diam, Россия), N, N'-метиленабисакриламид (бис-акриламид, Panreac / Applichem, Германия), агароза (Helicon, Россия), борная кислота (Panreac / Applichem, Германия), 6X Loading Dye Solution (Fermentas, Китай), FastRuler DNA Ladder (Fermentas, Китай), Thiazole Green (Biotium, США). Трис приобретен у MP Biomedicals (Франция); этаноламин (Sigma-Aldrich, США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид-гидрохлорид, EDC-HCl и натриевая соль N-гидроксисульфосукцинимиды (Roth, Германия), s-NHS (Chem-Impex Int'l, США). Среда DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), L-глутамин — 150 мг на 500 мл готовой среды (ПанЭко, Россия), бычья эмбриональная сыворотка 10% (HyClone, US). Раствор Версена (1мМ) (ПанЭко, Россия), трипсин-ЭДТА—0,25% (ПанЭко, Россия). Связывающий буфер (10 мМ HEPES/NaOH pH 7,4, 140 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂), FITC-Annexin V (50 мМ Трис, pH 7,0, 100 мМ NaCl, 1% БСА, 0,02% азид натрия (eBioscience™, США), PI (исходный водный раствор 400 мг/мл йодистого пропидия, 4,0 °С). Среда DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, US), трипсин-ЭДТА—0.05% (ПанЭко, Россия), раствор Версена (1мМ) (ПанЭко, Россия), рабочий раствор PBS (0,01М, pH 7,4), фиксатор: 4% параформальдегид, раствор бисбензимида («Hoechst 33342», «Sigma»). Рекомбинантный тромбин и фактор Ха получены от Haemtech Inc. (USA).

Буферные и физиологические растворы готовили с использованием сверхчистой воды (удельное сопротивление 18,2 Мом/см⁻¹).

3.1.1. ДНК-олигонуклеотиды

Эксперименты проводились с материалами, не содержащими примесей ДНК, РНК, ДНКазы и РНКазы. Олигонуклеотиды HD1(15-TBA), RA36, T12-HD1-T12, T3T4, T4T4, T4T3, T5T4, T4TGT, T4TTGTT, HD1-TT-14ss, HD1-TT-c14ss, HD1-c-T4T4, GR20-TT-20ss, GR20-TT-c20ss, были получены от Евроген, а U31, GR20 у ООО Ген-Терра (Россия) (Табл. 9). Названия аптамеров к тромбину с межмолекулярным G-квадруплексом составлены из последовательностей линкеров между модулем аптамера и последовательности петли в межмолекулярном G-квадруплексе. Последовательности с X-a-nss и X-a-ncss образуют комплементы друг другу (X- аптамер, «а» - последовательность линкера между аптамерным модулем и межмолекулярным дуплексом, «n» - длина последовательности межмолекулярного дуплекса, «ss» – single stand – одноцепочечная последовательность, «с» - комплементарная последовательность).

Таблица 9. Последовательности ДНК- олигонуклеотидов

Название	Последовательность 5'-3'	Мишень
HD1	GGTTGGTGTGGTTGG	тромбин
RA36	GGTTGGTGTGGTTGG-T- GGTTGGTGTGGTTGG	тромбин
T12-HD1-T12	T ₁₂ -GGTTGGTGTGGTTGG-T ₁₂	тромбин
T3T4	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₃ G ₄ T ₄ G ₄	тромбин
T4T4	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ T ₄ G ₄	тромбин
T4T3	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ T ₃ G ₄	тромбин
T5T4	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₅ G ₄ T ₄ G ₄	тромбин
T4TGT	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ TGTG ₄	тромбин
T4TTGTT	GGTTGGTGTGGTTGG-T ₄ G ₄ TTGTTG ₄	тромбин
HD1-TT-14ss	GGTTGGTGTGGTTGGTTCGAACGTGACATCG	тромбин
HD1-TT-c14ss	GGTTGGTGTGGTTGGTTCGATGTCACGTTCG	тромбин
HD1-TT-cT4T4	GGTTGGTGTGGTTGGTTCCCCAAAACCCCAA	тромбин
ьU31	ATCCAGAGTGACGCAGCATTTGTTTAATATGTT TTTAAATCCCCTTGTGGTGTGTTGTGGACACG GTGGCTTAGT	EGFR
GR20	ACGCACCATTTGTTTAATATGTTTTTTAATTCC CCTTGTGGTGTGT	EGFR
GR20-TT-20ss	ACGCACCATTTGTTTAATATGTTTTTTAATTCCC CTTGTGGTGTGTTTCTGGTCATGGCGGGC ATTTA	EGFR
GR20-TT-c20ss	ACGCACCATTTGTTTAATATGTTTTTTAATTCCCC TTGTGGTGTGTTTTAAATGCCCGCCATGACC AG	EGFR
20ss	CTGGTCATGGCGGGCATTTA	
c-20ss	TAAATGCCCGCCATGACCAG	
24ss	GAATTAATGCCCGCCATGACCAG	
c-24ss	CTGGTCATGGCGGGCATTTAATTC	

3.1.2. РНК- олигонуклеотиды

Эксперименты проводились с материалами, не содержащими примесей ДНК, РНК, ДНКазы и РНКазы. Олигонуклеотиды mE07, mE07-UU-24ss, mE07-UU-c24ss были получены с ФАМ меткой от у ООО Ген-Терра (Россия) (Табл. 10). Последовательности с X-a-nss и X-a-ncss образуют комплементы друг другу (X- аптамер, «a» - последовательность линкера между аптамерным модулем и межмолекулярным дуплексом, «n» - длина последовательности межмолекулярного дуплекса, «ss» – single stand – одноцепочечная последовательность, «c» - комплементарная последовательность).

Таблица 10. Последовательности РНК- олигонуклеотидов

Аптамер	Последовательность 5'-3'	Мишень
mE07	GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGC AUGUCAAAAGCCGGAACCGUCC	EGFR
mE07- UU-24ss	GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGC AUGUCAAAAGCCGGAACCGUCCUUGAAUU AAAUGCCCGCCAUGACCAG	EGFR
mE07- UU- c24ss	GGACGGAUUUAAUCGCCGUAGAAAAGCA UGUCAAAAGCCGGAACCGUCCUUCUGGUC AUGGCGGGCAUUUAAUUC	EGFR

3.1.3. Растворы для сборки конформации аптамеров

Олигонуклеотиды собраны при температуре 95°C в течение 5 мин, охлаждены до комнатной температуры в буферах указанный в таблице 11.

Концентрацию измеряли с помощью BioPhotometer plus Eppendorf AG (Германия).

Таблица 11. Названия и состав буферов. Во всех буферах pH=7,0.

Название	Состав
буф1.10К	20 мМ PBS, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl
буф2.10К	20 мМ Трис·HCl, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl
буф3.20К	160 мМ Na ₂ HPO ₄ , 20 мМ KH ₂ PO ₄
буф4.20К	160 мМ Na ₂ SO ₄ , 20 мМ KCl
буф5.340К	60 мМ KH ₂ PO ₄ , 140 мМ K ₂ HPO ₄
буф6.10К	20 мМ Трис·HCl, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl
буф7.10К	20 мМ Трис·HCl, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl, 5 мМ MgCl ₂

Димеры аптамеров собраны с помощью дуплексного «замка», в котором «хвосты» из нуклеотидов, посредством олигонуклеотидного линкера образуют дуплекс (HD1-ТТ-14ss + HD1-ТТ-с14ss = dHD1-14ds; T4T4 + HD1-с14ss(T4T4) = dHD1-14ds-T4T4; GR20-ТТ-20ss + GR20-ТТ-с20ss = GR20-20ds; mE07-UU-24ss + mE07-UU-с24ss = mE07-UU-с24ss ; «ds» – double stand – двуцепочечная последовательность, «d» впереди названия указывает на димерность конструкции).

3.2. Методы

3.2.1. Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматография была проведена по следующей методике: 1 мкл образца аптамера (при концентрации аптамера 1000 мкМ), 10 мкл (при

концентрации аптамера менее 1000 мкМ) в буферах из таблицы 6 вводили в хроматографическую систему Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), оснащенную четырехканальным насосом с дегазатором, термостатом колонки, автосэмплером, диодно-матричным УФ-детектором. Использовали программу управления ChemStation и колонку TSKgel G2000SWxl (7,8 × 300 мм, 5-микронные сферические частицы силикагеля, размер пор 125 Å, Agilent Technologies, США). Подвижная фаза 1 содержала 60 мМ КН₂РО₄, 140 мМ К₂НРО₄ рН 6,85 и 10 об. % ацетонитрила; Подвижная фаза 2 содержала 11 мМ КН₂РО₄, 9 мМ К₂НРО₄, рН 6,85, 160 мМ Na₂SO₄ и 10 об. % ацетонитрила. Скорость подвижной фазы в обоих случаях составляла 0,5 мл/мин, колонку термостатировали при 25,0°C. Поглощение при 260 нм регистрировали с шириной полосы 10 нм. Для элюированных образцов снимали УФ-спектры в диапазоне 200-400 нм, ширина полосы 10 нм; хроматограммы строили с использованием оптической плотности при 260 нм. Время удерживания t_R и полную ширину на половине максимума пиков определяли с помощью ChemStation (США). Объемы удерживания v_R использовались для дальнейших расчетов. Мертвый объем v_0 вычислен по формуле:

$$v_0 = t_0 * F, \quad (1)$$

где v_0 удерживаемый объем несорбируемого компонента, t_0 мертвое время удерживания синего декстрана, F скорость потока объемная скорость потока (см³/с) или (мл/мин).

Объем удерживания вычисляли по формуле:

$$v_R = t_R * F, \quad (2)$$

где v_R , объем удерживания, - объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество, t_R мертвое время удерживания синего декстрана; F - скорость потока (см³/с) или (мл/мин).

Построили график зависимости поглощения при 260 нм от относительного объема удерживания v_R/v_0 . Полный мертвый объем v_0

определяли, как объем удерживания дуплекса ДНК с 300 парами оснований (молекулярная масса > 150 кДа).

ВЭЖХ применяли для определения олигомерного состава аптамеров к тромбину и EGFR. Калибровку колонки дуплексами в подвижных фазах 1 и 2 использовали для определения степени олигомеризации мультимерных аптамеров.

Эксперименты выполнены совместно с Вадимом Нероновичем Ташлицким, МГУ имени М.В.Ломоносова.

3.2.2. Электрофорез в полиакриламидном геле

Конструкции димеров ДНК- аптамеров к тромбину с G-квадруплексным (T4T4) и с дуплексными (dHD1-14ds) «замками» анализировали с помощью гель-электрофореза в 12% полиакриламидном геле, содержащем акриламид/бис-акриламид в соотношении 19:1 в буфере TBE, полимеризованном смесью PSA и TEMED. Конструкции собраны при концентрации 1000 мкМ в буфере buf1.10K (20 mM PBS, 10 mM KCl, 140 mM NaCl) отжигали в течение 5 минут при 95 °C и охлаждали при комнатной температуре перед экспериментом. Далее разводили до необходимой концентрации (10 мкМ, 100 мкМ) в том же буфере и смешивали с 6-кратным раствором Loading dye. Гель окрашивали триазоловым зеленым путем помещения геля в буфер TBE с разбавленным в 2000 раз красителем с последующей инкубацией на шейкере в течение 30 минут. Визуализацию проводили с помощью Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США).

3.2.3. Спектроскопия кругового дихроизма и УФ-спектроскопия

Спектры кругового дихроизма и УФ измеряли с помощью КД-спектрометра CHIRASCAN (Applied Photophysics Ltd.; Leatherhead, Великобритания) и дихрографа MARK-5 (Jobin-Yvon; Монпелье, Франция), оборудованного термоэлектрическим регулятором температуры. Использовались кварцевые кюветы с оптическим путем 1 см для аптамеров с концентрацией 1-10 мкМ, 0,1 см для аптамеров с концентрацией 100 мкМ и 0,01 см для аптамеров с концентрацией 1000 мкМ. Спектры регистрировали в диапазоне длин волн 220–350 нм и температур 15–70°C со средней скоростью нагрева 0,5°C/мин. Димер ДНК- аптамера к тромбину с дуплексным «замком» dHD1-14ds собирали и исследовали в концентрации 100 мкМ в буфере buf1.10; T4T4 собирали и исследовали в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в буфере buf1.10K. Буфер использовали в качестве холостого образца, и его спектр автоматически вычитался из спектров олигонуклеотидов. Сигнал КД был пересчитан как молярный круговой дихроизм $\Delta\epsilon$.

Для обоих аптамеров изменением максимума УФ-поглощения ϵ_{260} было исследовано как при длине волны 260 нм, так и при 295 нм. Из спектров аптамеров была вычтена базовая линия, полученная измерением буфера, в котором были преформированы аптамеры. Данные кругового дихроизма ΔA_λ для каждой длины волны λ делили на концентрацию олигонуклеотида, $C(\text{аптамер})$, для получения молярного кругового дихроизма $\Delta\epsilon_\lambda$:

$$\Delta\epsilon_\lambda = (\Delta A_{\lambda, \text{ аптамер}} - \Delta A_{\lambda, \text{ базовая линия}}) / C_{\text{аптамер}}. \quad (3)$$

Для получения кривых плавления и сборки, вычисления температуры плавления и термодинамических параметров для каждого аптамера был построен график зависимости интенсивности положительного максимума КД от температуры, °C [85]. Для получения

кривых плавления и сборки и вычисления температуры плавления, $T_{пл}$, для аптамеров были построены графики зависимости молярного коэффициента экстинкции ϵ при определённой длине волны от температуры, °C. Температуры плавления рассчитывались с использованием Больцмановской аппроксимации кривых плавления для определенной длины волны.

Вся обработка данных и расчеты были выполнены с использованием программного обеспечения OriginPro 8.0 (Origin; Нортгемптон, Массачусетс, США).

Эксперименты выполнены совместно с Арутюняном Александром Миграновичем, МГУ имени М.В.Ломоносова

Термическую стабильность дуплексов, используемых для димеризации EGFR, оценивали с помощью двухлучевого спектрофотометра Hitachi U2900 (Токио, Япония). Источники света – дейтериевая и вольфрамовая лампы. Использовались прозрачные кварцевые кюветы с оптическим путем 1 см. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн 260 нм и температур 20–90°C. Буфер использовали в качестве холостого образца, и его спектр автоматически вычитался из спектров олигонуклеотидов. Программное обеспечение UV-solution. Комплементарные олигонуклеотиды, используемые для димеризации аптамеров к EGFR, 20-ss, 20-c-ss и 24-ss, 24-c-ss собирали и исследовали в концентрации 2 мкМ в буфере 20 мМ Трис·HCl, 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂.

Эксперименты выполнены совместно с Кубаревой Еленой Александровной, МГУ имени М.В.Ломоносова

3.2.4. Спектроскопия ЯМР ¹H

Растворы 1000 мкМ T4T4 и 670 мкМ dHD1-14ds собирали в буфере buf1.10K (20 мМ PBS, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl), отжигали в течение 5 минут

при 95°C и охлаждали при комнатной температуре или при температуре + 5°C. Образцы разбавляли D₂O (конечное содержание D₂O составляло 10%). Спектры ЯМР ¹H регистрировали на спектрометрах Bruker AVANCE III HD 300, Bruker AVANCE III HD 400 и Bruker AVANCE III 600 (Bruker, США). Химические сдвиги ¹H приведены относительно внешнего стандарта, 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната натрия (DSS). Одномерные протонные (¹H) спектры образцов в H₂O + D₂O (10%) были записаны при +20°C с использованием градиента импульсного поля WATERGATE для полного подавления сигнала H₂O. Для всех экспериментов использовалась задержка релаксации 1,5–2,5 с и время сбора данных 1,35–2,40 с. Для точной коррекции базовой линии области спектров иминопротонов для подавления «математическими» методами широкого олигомерного горба был применен алгоритм «многоточечной коррекции базовой линии Уиттекера» с использованием программного обеспечения «Bruker TopSpin 36» (Bruker, Биллерика, Массачусетс, США) и программное обеспечение «MestreNova 6.0» (Местрелаб, Испания), в дополнение к исходным собранным данным с применением T₂-релаксационного фильтра для частичного прямого подавления олигомеров во время сбора.

Растворы 1000 мкМ T4T4 и 670 мкМ dHD1-14ds собирали в буфере buf1.10K (20 mM PBS, 10 mM KCl, 140 mM NaCl), отжигали в течение 5 минут при 95°C и охлаждали при комнатной температуре или при температуре +5°C.

Эксперименты выполнены совместно с Новиковым Романом, ИМБ РАН

3.2.5. Интерферометрия биослоев

Эксперименты проводились с использованием интерферометрии биослоев Octet Red 96 (ForteBio, США) и программного обеспечения Data

Acquisition v.10.0 (ForteBio, США). 96-луночный черный микропланшет (Greiner Bio-One, Австрия) термостатировали при 25°C и встряхивали со скоростью 1000 об/мин. Аптамеры преформировали при концентрации 1 мМ в буфере (20 мМ Трис·HCl, pH 7,0, 140 мМ NaCl и 10 мМ KCl), нагревали при 95°C в течение 5 минут и охлаждали при комнатной температуре перед экспериментом.

Биосенсоры второго поколения для иммобилизации через аминогруппу (ForteBio, США) гидратировали в буфере в течение 10 мин, а затем помещали в активирующий раствор (200 мМ EDC и 100 мМ s-NHS в воде) на 5 мин. Белки (тромбин или фактор Ха) разводили до 2,5 мг/мл в 40 мМ фосфатном буфере при pH 6,4. Активированные биосенсоры помещали в раствор белка на 10 мин, а затем в раствор 800 мМ этаноламина-HCl, pH 8,9 на 5 мин. Сенсоры уравнивали буфером в течение 2 мин. Для экспериментов по связыванию сенсоры помещали в 25–500 нМ раствор аптамеров в буфере на 200 с (стадия ассоциации), а затем в буфер на 300 с (стадия диссоциации). Регенерацию сенсора проводили в 800 мМ этаноламин-HCl, pH 8,9, в течение 16 с и буфере в течение 16 с, трижды. Сигнал сенсора с иммобилизованным фактором Ха вычитался из сигнала сенсора тромбина. Кинетические константы и константы равновесия рассчитывались по стандартной методике [120]. Простое равновесие связывания со стехиометрией 1:1 описывается следующим образом:



где А представляет собой аптамер, Т представляет собой мишень (белок) и С представляет собой комплекс аптамер-мишень. Равновесие (константа диссоциации – уравнение 7) может быть описано с использованием константы диссоциации K_d (ур. 5), константы ассоциации K_a (ур. 6).

$$K_d = [A][T]/[C] \quad (5)$$

$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{[C]}{[A][T]} \quad (6)$$

$$K_d = k_d/k_a \quad (7)$$

Вся обработка данных и расчеты были выполнены с использованием программного обеспечения OriginPro 8.0 [120].

Константа диссоциации рассчитывалась с помощью аппроксимации экспериментальных кривых диссоциации (в промежутке от 2 до 500 с) экспоненциальной функцией Exp2PMod1, OriginPro 2020:

$$S = S_0 * \exp(-K_d * t) \quad (8)$$

где S – сигнал (нм), S_0 – минимальный сигнал, t – время (с).

Этап ассоциации (аптамер-тромбин) (первые 200 с) аппроксимировали с помощью экспоненциальной функции BoxLucas1, OriginPro 8:

$$S = a1 * (1 - \exp(-(K_a[C] + k_d) * t)) \quad (9)$$

где S – сдвиг (нм), $a1$ – постоянная, t – время (с).

Тангенс угла наклона линейной аппроксимации этого графика для каждого комплекса равен константе скорости ассоциации K_a с погрешностью, равной среднеквадратичному отклонению экспериментальных точек от теоретической кривой. Качество аппроксимации оценивалось по значениям коэффициента детерминации $R^2 \sim 1,0$.

3.2.6. Культивирование линии клеток A431

Клетки были получены из Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, культивированы Екатериной Анатольевной Савченко. Клеточная линия A431, примененная в экспериментах для оценки связывания (связывание аптамеров с клетками, оцененное проточной цитофлуориметрией, локализация аптамеров в клеточной линии A431, оцененная конфокальной микроскопией) и функциональной активности (выживаемость клеток, оцененная МТС тестом), была культивирована в ростовой среде DMEM/F12 с пируватом натрия с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% раствора HEPES для поддержания pH, 1% GlutaMAX и 1% антибиотика/антимикотика (раствор пенициллина/стрептомицина/амфотерицина). Флаконы с клетками помещены в CO₂-инкубатор, при температуре 37°C.

При пересеве клетки были сняты 0,25% раствором трипсина, с добавлением 1 мл во флакон с клетками, отмытыми фосфатно-солевым буфером. Реакция трипсина останавливалась добавлением во флакон 1 мл ростовой среды. Клетки были отобраны в пробирку и центрифугированы в течение 5 минут при 1000 об/мин. Жидкость убирали, добавляли свежую среду далее пересевали в новые флаконы для дальнейшего культивирования и последующей заморозки или использовали для проведения эксперимента.

3.2.7. Конфокальная микроскопия

Локализация ДНК-аптамеров к EGFR в клетках линии A431 исследована с помощью конфокального микроскопа Carl Zeiss серии LSM-710 с короткоимпульсным фемтосекундным инфракрасным лазером с

перестраиваемым диапазоном (800 - 1500 нм) для мультифотонного возбуждения флуоресценции. Сканирующий модуль LSM 710, с двумя одноканальными высокочувствительными детекторами и с 34-х канальным спектральным детектором для быстрого параллельного захвата полного эмиссионного профиля. Детектор проходящего света - два независимых гальванометрических сканирующих зеркала. Сканирующее разрешение от 4 x 1 до 6144 x 6144 пикселей; AOTF – температурно-стабилизированный акустооптический плавнорегулируемый фильтр. Использовано программное обеспечение NIS-Elements ver.5.11 (Zeiss, Япония), с модулем для автоматизации скрининга JOBS. Возбуждение флуоресценции осуществлялось при помощи 16-канального блока LED рЕ-4000 (CoolLED, Великобритания). Сканирование культуральных планшетов проведено с использованием Plan Apo x10 объектива (NA=0,45), сканирование многолуночных покровных 60 стекол 8-well μ -Slide (IBIDI, Германия) с использованием PlanApo 20x объектива (NA=0,75).

С помощью конфокальной микроскопии изучена локализация ДНК-аптамеров (U31, GR20, dGR20-20ds) и РНК-аптамеров к EGFR (mE07, mE07-TT-c24ss, mE07-24ds, dmE07-24ds) с флуоресцентной меткой ФАМ на 5'конце (λ_{ex} = 490; λ_{em} =513) на клетках А431. Клетки инкубировали в среде добавляя 50/50 среды с 2 мкМ флуоресцентно мечеными аптамерами в течение 3 часов. В качестве отрицательного контроля использована клеточная линия А431 без аптамеров. В качестве положительного контроля – клеточная линия А431 с ДНК-аптамером к EGFR U31. Клетки культивировались в планшетах или многолуночных покровных стеклах. Клеточные культуры во влажной камере помещали в термостат при 37°C и 5% CO₂ на 3 часа. Раствором PBS (рН 7,2-7,4) отмывали (2 раза) от среды покровные стекла с клеточными культурами, и далее клетки фиксировали с добавлением 200 мкл 4% раствора параформальдегида в PBS в течение 30 минут при +4 °С. Снова отмывали

раствором PBS (3 раза). Раствор бисбензимида («Hoechst 33342», «Sigma» разведение 1:500 в PBS) использован для окраски ядер клеток. Окрашенные клеточные культуры были на покровных стеклах, покрытые средой на основе поливинилового спирта Mowiol 4-88 с 1% DABCO в качестве антиоксиданта. Анализ результатов проведен при помощи программы ImageJ.

Эксперименты выполнены совместно с Фаб Ликой Виленовной, НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н. Н. Бурденко.

3.2.8. Проточная цитофлуориметрия

Оборудование проточной цитофлуориметрии: проточный цитофлуориметр-сортировщик клеток Novocyte.

Для проточной цитофлуориметрии выращенные клетки переведены в суспензию, разделены на порции по 500 000 клеток, промывали фосфатным буфером и ресуспендировали в 500 мкл PBS, содержащего необходимую концентрацию ФАМ- меченных аптамеров (ДНК- аптамеры: U31, GR20, dGR20-20ds, РНК-аптамеры: mE07, mE07-UU-24ss, mE07-UU-c24ss, dmE07-24ds?). Добавлен конъюгат AnnexinV-FITC (концентрация 1 мг/мл). Концентрация аптамеров при инкубации с клетками линии A431 составляла 2 мкМ. В качестве отрицательного контроля использованы клетки без аптамера с добавлением буфера. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с аптамером к EGFR, U31. Контрольные клетки инкубировали с ФАМНарм.

Клетки инкубированы 1 ч при комнатной температуре в темноте. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte, измеряли интенсивность сигнала флуоресценции канала FITC, 488 нм, регистрировали 10 000 событий. Флуоресценцию рассчитывали относительно контрольной популяции клеток, которую инкубировали без аптамера.

Эксперименты выполнены совместно с Савченко Екатериной Анатольевной, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

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. 11). 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 (Т4Т4) с межмолекулярным G-квадруплексом образует димер. При концентрации 1000 мкМ выход димеров достигал 50% (Рис. 15). На определяемый выход конструкций влияет состав подвижной фазы при разделении олигомеров, а также состав буфера, в котором была проведена сборка конструкции (Рис. 18).

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, ТТГТТ и ТГТ. Петли ТГТ и ТТГТТ увеличивают выход димера

на 20% (Рис. 21). 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. 20).

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. 27).

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. 29).

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. 29), и не наблюдаются в ядрах клеток A431 (Рис. 31).

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 литературы

1. Wang R.E., Wu H., Niu Y. // Improving the stability of aptamers by chemical modification // *Curr. Med. Chem.* 2011. Vol. 18. P. 4126–4138.
2. Yu Y., Liang C., Lv Q., Li D., Xu X. // Molecular selection, modification and development of therapeutic oligonucleotide aptamers // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17. P. 358.
3. Ni S., Yao H., Wang L., Lu J., Jiang F. // Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. P. 1683.
4. Röthlisberger P., Hollenstein M. // Aptamer chemistry // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. Vol. 134. P. 3–21.
5. Adachi T., Nakamura Y. // Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application // *Molecules.* 2019. Vol 24. P 4229.
6. Odeh F., Nsairat H., Alshaer W., Ismail M.A., Esawi E., Qaqish B. // Aptamers chemistry: Chemical modifications and conjugation strategies // *Molecules.* 2020. Vol. 25. P. 3.
7. Bouchard R., Hutabarat M., Thompson M. // Discovery and Development of Therapeutic Aptamers // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2010. Vol. 50(1). P. 237–257.
8. Acquah C., Danquah M. K., Agyei D., Moy C. K. S., Sidhu A. // Deploying aptameric sensing technology for rapid pandemic monitoring // *Critical Reviews in Biotechnology* 2015. Vol. 36(6). P. 1010–1022.
9. Sagi, J. // G-quadruplexes incorporating modified constituents: a review. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2013. Vol. 32(3). P. 477–511.
10. Noh J., Xiuqiang W., Angelica D., Dana G., Christopher B., Jonathan V., Weimin S. // Measurement of cetuximab and panitumumab-unbound serum

EGFR extracellular domain using an assay based on slow off-rate modified aptamer (SOMAmer) reagents // PLoS ONE. 2013. Vol 8(8). e71703.

11. Cho Y., Lee Y.B., Lee J.H., Lee D.H., Cho E.J., Yu S.J., Kim Y.J., Kim J.I., Im J.H., Lee J.H. // Modified AS1411 Aptamer Suppresses Hepatocellular Carcinoma by Up-Regulating Galectin-14 // PLoS ONE. 2016. Vol 11. e0160822.

12. Fan X.; Sun L., Wu Y., Zhang L., Yang Z. // Bioactivity of 20-deoxyinosine-incorporated aptamer AS1411 // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 25799.

13. Virgilio A., Amato T., Petraccone L., Esposito F., Grandi N., Tramontano E., Romero R., Haider S., Gomez-Monterrey I., Novellino E. // Improvement of the activity of the anti-HIV-1 integrase aptamer T30175 by introducing a modified thymidine into the loops // Sci. Rep. 2018. Vol. 8. P. 7447.

14. Fan X., Sun L., Li K., Yang X., Cai B., Zhang Y., Zhu Y., Ma Y., Guan Z., Wu Y. // The Bioactivity of D-/L-Isonucleoside and 20-Deoxyinosine-Incorporated Aptamer AS1411s Including DNA Replication/MicroRNA Expression // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2017. Vol 9. P 218–229.

15. Mukundan, V.T., Do, N.Q., Phan, A.T. // HIV-1 integrase inhibitor T30177 forms a stacked dimeric G-quadruplex structure containing bulges // Nucleic Acids Res. 2011. Vol 39. P 8984–8991.

16. Kovačič M., Podbevšek P., Tateishi-Karimata H., Takahashi, S., Sugimoto N., Plavec J. // Thrombin binding aptamer G-quadruplex stabilized by pyrene-modified nucleotides // Nucleic Acids Res. 2020. Vol. 48. P. 3975–3986.

17. Goji S., Matsui J. // Direct Detection of Thrombin Binding to 8-Bromodeoxyguanosine-Modified Aptamer: Effects of Modification on Affinity and Kinetics // Nucleic Acids 2011. Vol. 2011. P. 316079.

18. Saccà B., Lacroix L., Mergny J. L. // The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33. P. 1182–1192.

19. Zhao X., Liu B., Yan J., Yuan Y., An L., // Guan Y. Structure variations of TBA G-quadruplex induced by 20-O-methyl nucleotide in K⁺ and Ca²⁺ environments // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2014. Vol. 46. P. 837–850.

20. Varada M., Aher M., Erande N., Kumar V.A., Fernandes M. // Methoxymethyl Threofuranosyl Thymidine (40-MOM-TNA-T) at the T7 Position of the Thrombin-Binding Aptamer Boosts Anticoagulation Activity, Thermal Stability, and Nuclease Resistance // *ACS Omega* 2020. Vol 5. P 498–506.
21. Kotkowiak W., Wengel J., Scotton C.J., Pasternak A. // Improved RE31 Analogues Containing Modified Nucleic Acid Monomers: Thermodynamic, Structural, and Biological Effects // *J. Med. Chem.* 2019. Vol 62. P 2499–2507.
22. Zaitseva M., Kaluzhny D., Shchyolkina A., Borisova O., Smirnov I., Pozmogova G. // Conformation and thermostability of oligonucleotide d(GGTTGGTGTGGTTGG) containing thiophosphoryl internucleotide bonds at different positions // *Biophys. Chem.* 2010. Vol 146. P 1–6.
23. Gunjal A.D., Fernandes M., Erande N., Rajamohanan P.R., Kumar, V.A. // Functional isoDNA aptamers: Modified thrombin binding aptamers with a 20-50-linked sugar-phosphate backbone (isoTBA) // *Chem. Commun.* 2014. Vol 50. P 605–607.
24. Esposito V., Scuotto M., Capuozzo A., Santamaria R., Varra M., Mayol L., Virgilio, A., Galeone A. A straightforward modification in the thrombin binding aptamer improving the stability, affinity to thrombin and nuclease resistance. // *Org. Biomol. Chem.* 2014. Vol 12. P 8840–8843.
25. Kosman J., Juskowiak B. Thrombin-Binding Aptamer with Inversion of Polarity Sites (IPS): Effect on DNzyme Activity and Anticoagulant Properties. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol 22. P 7902.
26. Miranda A., Santos T., Largy E., Cruz C. Locking up the AS1411 Aptamer with a Flanking Duplex: Towards an Improved Nucleolin-Targeting. // *Pharmaceuticals* 2021. Vol 14. P 121.
27. Carvalho J., Lopes-Nunes J., Lopes A.C., Cabral Campello M.P., Paulo A., Queiroz J.A., Cruz C. Aptamer-guided acridine derivatives for cervical cancer. // *Org. Biomol. Chem.* 2019. Vol 17. P 2992–3002.
28. Mazurov A.V., Titaeva E.V., Khaspekova S.G., Storojilova A.N., Spiridonova V.A., Kopylov A.M., Dobrovolsky A.B. Characteristics of a new DNA

aptamer, direct inhibitor of thrombin. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol 150. P 422–425.

29. Dolinnaya N.G., Yuminova A.V., Spiridonova V.A., Arutyunyan A.M., Kopylov A.M. Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012. Vol 30. P 524–531.

30. Russo Krauss I., Spiridonova V., Pica A., Napolitano V., Sica F. Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding. // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol 44. P 983–991.

31. Savchik E.Y., Kalinina T.B., Drozd N.N., Makarov V.A., Zav'yalova E.G., Lapsheva E.N., Mudrik N.N., Babij A.V., Pavlova G.V., Golovin A.V. et al. Aptamer RA36 inhibits of human, rabbit, and rat plasma coagulation activated with thrombin or snake venom coagulases. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. Vol 156. P 44–48.

32. Tucker W.O., Shum K.T., Tanner J.A. G-quadruplex DNA aptamers and their ligands: Structure, function and application. // *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol 18. P 2014–2026.

33. Robinson J., Raguseo F., Nuccio S.P., Liano D., Di Antonio M. DNA G-quadruplex structures: More than simple roadblocks to transcription? // *Nucleic Acids Res.* 2021. Vol 49. P 8419–8431.

34. Bhattacharyya D., Mirihana Arachchilage G., Basu S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. // *Front. Chem.* 2016. Vol 4. P 38.

35. Bochman M.L., Paeschke K., Zakian V.A. DNA secondary structures: Stability and function of G-quadruplex structures. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. Vol 13. P 770–780.

36. Ogloblina A.M., Bannikova V.A., Khristich A.N., Oretskaya T.S., Yakubovskaya M.G., Dolinnaya N.G. Parallel G-Quadruplexes Formed by Guanine-Rich Microsatellite Repeats Inhibit Human Topoisomerase I. // *Biochemistry* 2015. Vol 80. P 1026–1038.

37. Yang D. G-Quadruplex DNA and RNA. // *Methods Mol. Biol.* 2019. Vol 2035. P 1–24.
38. Musumeci D., Montesarchio D. Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: A focus on the thrombin binding aptamer. // *Pharmacol. Ther.* 2012. Vol 136. P 202–215.
39. Vorobyeva M., Vorobjev P., Venyaminova A. Multivalent aptamers: Versatile tools for diagnostic and therapeutic applications. // *Molecules* 2016. Vol 21. P 1613.
40. Gao S., Zheng X., Jiao B., Wang L. Post-SELEX optimization of aptamers. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. Vol 408. P 4567–4573.
41. Hasegawa H., Savory N., Abe K., Ikebukuro K. Methods for improving aptamer binding affinity. // *Molecules* 2016. Vol 21. P 421.
42. Nimjee SM. RR White, RC Becker and BA Sullenger. Aptamers as therapeutics. // *Ann Review Pharm Toxicol.* 2017. Vol 57. P 61–79.
43. Rozenblum GT. VG Lopez, AD Vitullo and M Radrizzani. Aptamers: current challenges and future prospects. // *Exp Opin Drug Discov.* 2015. Vol 11. P 127–135.
44. Liu X, P Wang, C Zhang and Z Ma. Epidermal growth factor receptor (EGFR): a rising star in the era of precision medicine of lung cancer. // *Oncotarget* .2017. Vol 8. P 50209– 50220.
45. Wang Z and S Fang. EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. // *Drug Des Develop Ther.* 2014. Vol 8. P 1595–1611.
46. Gan HK, AN Cvrljevic and TG Johns. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. // *FEBS J.*2013. Vol 280. P 5350–5370.
47. Maier K.E., Levy M. From selection hits to clinical leads: Progress in aptamer discovery. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2016. Vol 5. P 16014–16023.
48. Santosh B., Yadava P.K. Nucleic acid aptamers: Research tools in disease diagnostics and therapeutics. // *Biomed. Res. Int.* 2014. Vol. P 50451–50464.

49. Ma H., Liu J., Ali M.M., Mahmood M.A.I., Labanieh L., Lu M., Iqbal S.M., Zhang Q., Zhao W., Wan Y. Nucleic acid aptamers in cancer research, diagnosis and therapy. // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol 44. P 1240–1256.
50. Ku T.H., Zhang T., Luo H., Yen T.M., Chen P.W., Han Y., Lo Y.H. Nucleic acid aptamers: An emerging tool for biotechnology and biomedical sensing. // *Sensors* 2015. Vol 15. P 16281–16313.
51. Dhiman A., Kalra P., Bansal V., Bruno J.G., Sharma T.K. Aptamer-based point-of-care diagnostic platforms. // *Sens. Actuators B Chem.* 2017. Vol 246. P 535–553.
52. Hori S.I., Herrera A., Rossi J.J., Zhou J. Current advances in aptamers for cancer diagnosis and therapy. // *Cancers* 2018. Vol 10. P 9.
53. Kulabhusan P.K., Hussain B., Yüce M. Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents. // *Pharmaceutics* 2020. Vol 12. P 646.
54. Gestwicki J. E., Cairo, C. W., Strong, L. E., Oetjen K. A., Kiessling L. L. (2002). Influencing Receptor–Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. // *Journal of the American Chemical Society* 2002. Vol 124(50). P 14922–14933
55. Fasting C., Schalley C. A., Weber M., Seitz O., Hecht S., Kokschi B., Haag R. (2012). Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. // *Angewandte Chemie International Edition* 2012. Vol 51(42). P 10472–10498.
56. Sean B. Yeldell and Oliver Seitz, Nucleic acid constructs for the interrogation of multivalent protein interactions. // *Chem. Soc. Rev.* 2020. Vol 49. P 6848-6865.
57. Hasegawa H., Taira K., Sode K., Ikebukuro K. Improvement of aptamer affinity by dimerization. // *Sensors* 2008. Vol 8. P 1090–1098.
58. Elbaz J., Shlyahovsky B., Li D. Parallel analysis of two analytes in solutions or on surfaces by using a bifunctional aptamer: Applications for biosensing and logic gate operations. // *ChemBioChem* 2008. Vol 9. P 232–239.

59. Goda T., Higashi D., Matsumoto A., Hoshi T., Sawaguchi T., Miyahara Y. Dual aptamer-immobilized surfaces for improved affinity through multiple target binding in potentiometric thrombin biosensing. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. Vol 73. P 174–180.
60. Müller J., Wulffen B., Pöttsch B., Mayer G. Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. // *ChemBioChem* 2007. Vol 8. P 2223–2226.
61. Soule E.E., Bompiani K.M., Woodruff R.S., Sullenger B.A. Targeting two coagulation cascade proteases with a bivalent aptamer yields a potent and antidote-controllable anticoagulant. // *Nucleic Acid Ther* 2016. Vol 26. P 1–9.
62. Zhang Z., Ali M.M., Eckert M.A., Kang D.K., Chen Y.Y., Sender L.S., Fruman D.A., Zhao W. A polyvalent aptamer system for targeted drug delivery. // *Biomaterials* 2013. Vol 34. P 9728–9735.
63. Riese S.B., Buscher K., Enders S., Kuehne C., Tauber R., Dervede J. Structural requirements of mono- and multivalent L-selectin blocking aptamers for enhanced receptor inhibition in vitro and in vivo. // *Nanomedicine* 2016. V 12. P 901–908
64. Umehara T., Fukuda K., Nishikawa F., Kohara M., Hasegawa T., Nishikawa S. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. // *J. Biochem.* 2005. Vol 137. P 339–347.
65. Burke D.H., Willis J.H. Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through Chimeric SELEX. // *RNA* 1998. Vol 4. P 1165–1175.
66. Ahmad K.M., Xiao Y., Tom Soh H. Selection is more intelligent than design: Improving the affinity of a bivalent ligand through directed evolution. // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol 40. P 11777–11783.
67. Wang S., Shepard J.R.E., Shi H. An RNA-based transcription activator derived from an inhibitory aptamer. // *Nucleic Acids Res.* 2010. Vol 38. P 2378–2386.

68. Zhao X., Lis J.T., Shi H. A systematic study of the features critical for designing a high avidity multivalent aptamer. // *Nucleic Acid Ther.* 2013. Vol 23. P 238–242.
69. Di Giusto D.A., King G.C. Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol 279. P 46483–46489.
70. Di Giusto D.A., Knox S.M., Lai Y., Tyrelle G.D., Aung M.T., King G.C. Multitasking by multivalent circular DNA aptamers. // *ChemBioChem* 2006. Vol 7. P 535–544.
71. Kim Y., Cao Z., Tan W. Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008. Vol 105. P 5664–5669.
72. Tian L., Heyduk T. Bivalent ligands with long nanometer-scale flexible linkers. // *Biochemistry* 2009. Vol 48. P 264–275.
73. Mallikaratchy P.R., Ruggiero A., Gardner J.R., Kuryavyi V., Maguire W.F., Heaney M.L., McDevitt M.R., Patel D.J., Scheinberg D.A. A multivalent DNA aptamer specific for the B-cell receptor on human lymphoma and leukemia. // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol 39. P 2458–2469.
74. Yang L., Meng L., Zhang X., Chen Y., Zhu G., Liu H., Xiong X., Sefah K., Tan W. Engineering polymeric aptamers for selective cytotoxicity. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol 133. P 13380–13386.
75. Hsu C.L., Chang H.T., Chen C.T., Wei S.C., Shiang Y.C., Huang C.C. Highly efficient control of thrombin activity by multivalent nanoparticles. // *Chem. A Eur. J.* 2011. Vol 17. P 10994–11000.
76. Huang S.S., Wei S.C., Chang H.T., Lin H.J., Huang C.C. Gold nanoparticles modified with self-assembled hybrid monolayer of triblock aptamers as a photoreversible anticoagulant. // *J. Control. Release* 2016. Vol 221. P 9–17.
77. Li H., Hu H., Zhao Y., Chen X., Li W., Qiang W., Xu D. Multifunctional aptamer-silver conjugates as theragnostic agents for specific cancer

cell therapy and fluorescence-enhanced cell imaging. // *Anal. Chem.* 2015. Vol 87. P 3736–3745.

78. Stephanopoulos N., Tong G.J., Hsiao S.C., Francis M.B. Dual-surface modified virus capsids for targeted delivery of photodynamic agents to cancer cells. // *ACS Nano* 2010 Vol 4. P 6014–6020.

79. Pestourie C., Tavitian B., Duconge F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. // *Biochimie* 2005. Vol 87(9-10). P 921–930.

80. Zavyalova E., Kopylov A. DNA aptamer-based molecular nanoconstructions and nanodevices for diagnostics and therapy. // In: *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs*; Grumezesku A., Ed.; Elsevier: Chennai, 2018. Vol. P 249–290.

81. Bock L. C., Griffin L. C., Latham J. A., Vermaas E. H., Toole J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. // *Nature* 1992 Vol 355(6360). P 564–566.

82. Griffin L. C., Tidmarsh G. F., Bock L. C., Toole, J. J., Leung, L. L. K. In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. // *Blood*, 1993. Vol 81(12). P 3271–3276.

83. Russo Krauss I., Merlino A., Randazzo A., Novellino E., Mazzarella L., Sica F. High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombinbinding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity. // *Nucleic Acids Research*, 2012. Vol 40(16). P 8119–8128.

84. Pica A., Russo Krauss. I., Merlino A., Nagatoishi S., Sugimoto N., Sica F. Dissecting the contribution of thrombin exosite I in the recognition of thrombin binding aptamer. // *FEBS J.* 2013. Vol 280. P 6581–6588.

85. Tsiang M., Jain A.K., Dunn K.E., Rojas M.E., Leung L.L., Gibbs C.S. Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J. Biol. // Chem.* 1995. Vol 270. P 16854–16863.

86. Spiridonova V.A., Barinova K.V., Glinkina K.A., Melnichuk A.V., Gainutdinov A.A.; Safenkova I.V., Dzantiev B.B. A family of DNA aptamers with

varied duplex region length that forms complexes with thrombin and prothrombin. // *FEBS Lett.* 2015. Vol 589. P 2043–2049.

87. Zavyalova E. G., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A. Module-activity relationship of G-quadruplex based DNA aptamers for human thrombin. // *Current Medicinal Chemistry*, 2013. Vol 20(38). P 4836–4843.

88. Russo Krauss I., Pica A., Merlino A., Mazzarella L., Sica F. Duplex-quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer. // *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* 2013. Vol 69 (12). P 2403–2411.

89. Tasset D.M., Kubik M.F., Steiner W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes 11 Edited by R. // *Huber. J. Mol. Biol.* 1997. Vol 272. P 688–698.

90. Mazurov A.V., Titaeva E.V., Khaspekova S.G., Storojilova A.N., Spiridonova V.A., Kopylov A.M., Dobrovolsky A.B. Characteristics of a new DNA aptamer, direct inhibitor of thrombin. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol 150. P 422–425.

91. Wakui K., Yoshitomi T., Yamaguchi A., Tsuchida M., Saito S., Shibukawa M., Furusho H., Yoshimoto K. Rapidly Neutralizable and Highly Anticoagulant Thrombin-Binding DNA Aptamer Discovered by MACE SELEX. // *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2019. Vol 16. P 348–359.

92. Troisi R., Napolitano V., Spiridonova V., Russo Krauss I., Sica F. Several structural motifs cooperate in determining the highly effective anti-thrombin activity of NU172 aptamer. // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol 46. P 12177–12185.

93. Heyduk E., Heyduk T. Nucleic Acid-Based Fluorescence Sensors for Detecting Proteins. // *Anal. Chem.* 2005. Vol 77. P 1147–1156.

94. Müller J., Freitag D., Mayer G., Pöttsch B. Anticoagulant characteristics of HD1-22, a bivalent aptamer that specifically inhibits thrombin and prothrombinase. // *J. Thromb. Haemost.* 2008. Vol 6. P 2105–2112.

95. Zavyalova E., Golovin A., Reshetnikov R., Mudrik N., Panteleyev D., Pavlova G., Kopylov A. Novel modular DNA aptamer for human thrombin with high anticoagulant activity. // *Curr. Med. Chem.* 2011. Vol 18. P 3343–3350.
96. Poniková S., Tlučková K., Antalík M., Víglaský V., Hianik T. The circular dichroism and differential scanning calorimetry study of the properties of DNA aptamer dimers. // *Biophys. Chem.* 2011. Vol 155. P 29–35.
97. Hianik T., Grman I., Karpisova I. The effect of DNA aptamer configuration on the sensitivity of detection thrombin at surface by acoustic method. // *Chemical Communications*, 2009. Vol 41. P 6303.
98. Grijalvo S., Avin˜o A., Eritja R., Oligonucleotide delivery: a patent review (2010-2013). // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2010-2013. Vol 24 (7). P 801819.
99. Lincoff A. M., Mehran R., Povsic T. J., Zelenkofske S. L., Huang Z., Armstrong P. W., Alexander J. H. Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): a randomised clinical trial. // *The Lancet*, 2016. Vol 387(10016). P 349–356.
100. Gostring L., Chew M.T., Orlova A., Wennborg A., Carlsson J., Frejd F.Y. Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: Methodological aspects. // *International J. Oncol.* 2009 Vol 36. P 757-763.
101. Yang S.X., Simon R.M., Tan A.R., Nguyen D., Swain S.M. Gene expression patterns and profile changes pre- and post- Erlotinib treatment in patients with metastatic breast cancer. // *Clin. Cancer. Res.* 2005. Vol 11(17). P 6226-6232.
102. Ladanyi M., Pao W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. // *Modern Pathology.* 2008. Vol 21. P S16-S22.
103. Flynn J.F., Wong C., Wu, J.M. Anti-EGFR therapy: Mechanism and advances in clinical efficacy in breast cancer. // *J. Oncol.* 2009. Vol. P 526963.
104. Kim K, SJ Lee, S Ryu and D Han. Efficient isolation and elution of cellular proteins using aptamer-mediated protein precipitation assay. // *Biochem Biophys Res Commun* 2014. Vol. P 448:114–119.
105. Damase TR, TA Miura, CE Parent and PB Allen. Application of the open qPCR instrument for the in vitro selection of DNA aptamers against epidermal

growth factor receptor and drosophila C virus. // ACS Comb Sci 2018. Vol 20. P 45–54.

106. Damase TR and PB Allen. Idiosyncrasies of thermofluorimetric aptamer binding assays. // Biotechniques 2019. Vol 66. P 121–127.

107. Tan Y, YS Shi, XD Wu, HY Liang, YB Gao, SJ Li, XM Zhang, F Wang and TM Gao. DNA aptamers that target human glioblastoma multiforme cells overexpressing epidermal growth factor receptor variant III in vitro. // Acta Pharmacol Sinica , 2013. Vol 34. P 1491–1498.

108. Wu X, H Liang, Y Tan, C Yuan, S Li, X Li, G Li, Y Shi and X Zhang. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo. // PLoS One, 2014. Vol 9. P 90752.

109. Liu Y, CT Kuan, J Mi, X Zhang, BM Clary, DD Bigner and BA Sullenger. Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis. // Biol Chem. 2009. Vol 390. P 137–144.

110. Li N, HH Nguyen, MB and AD Ellington. Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer. // PLoS One , 2011. Vol 6. P 20299.

111. Esposito CL, D Passaro, I Longobardo, G Condorelli, P Marotta, A Affuso, V de Franciscis and L Cerchia. A neutralizing RNA aptamer against EGFR causes selective apoptotic cell death. // PLoS One, 2011. Vol 6. P 24071.

112. Li N, T Larson, HH Nguyen, KV Sokolov and AD Ellington. Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells. // Chem Commun (Camb) 2010. Vol 46. P 392–394.

113. Cheng S, O Jacobson, G Zhu, Z Chen, SH Liang, R Tian, Z Yang, G Niu, X Zhu and X Chen. PET imaging of EGFR expression using an ¹⁸F-labeled RNA aptamer. // Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2019. Vol. 46. P. 948–956.

114. Park NJ, X Wang, A Diaz, DM Goos-Root, C Bock, JD Vaught, W Sun and CM Strom. Measurement of cetuximab and panitumumab-unbound serum EGFR extracellular domain using an assay based on slow off-rate modified aptamer (SOMAmer) reagents. // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. 71703.

115. Elena Zavyalova, Askar Turashev, Anastasia Novoseltseva, Valeriia Legatova, Olga Antipova, Ekaterina Savchenko, Sonja Balk, Andrey Golovin Galina Pavlova, Alexey Kopylov, Pyrene-Modified DNA Aptamers with High Affinity to Wild-Type // EGFR and EGFRvIII. 2020. Vol.30. P. 3.
116. V. Avutu, Avidity Effects of MinE07, an Anti-EGFR Aptamer, on Binding to A431 Cells. // The University of Texas at Austin .2010.
117. Wolff E.A., Schreiber G.J., Cosand W.L., Raff H.V. Monoclonal antibody homodimers: Enhanced antitumor activity in nude mice. // *Canc. Res.* 1993. Vol. 53. P. 2560-2565.
118. R. Ueki, A. Ueki, N. Kanda and S. Sando, *Angew. Chem., // Int. Ed.*, 2016. Vol. 55. P. 579–582.
119. R. Ueki, S. Atsuta, A. Ueki and S. Sando. // *J. Am. Chem. Soc.*, 2017. Vol 139. P 6554–6557.
120. O'Shannessy D.J., Brigham-Burke M., Soneson K.K., Hensley P., Brooks I. Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. // *Anal. Biochem.* 1993. Vol. 212. P. 457–468.
121. Macaya R. F., Schultze P., Smith F. W., Roe J. A., Feigon J. Thrombin-Binding DNA Aptamer Forms a Unimolecular Quadruplex Structure in Solution. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993. Vol. 90. P. 3745–3749.
122. Ishizuka T., Yamashita A., Asada Y., Xu Y. Studying DNA G-Quadruplex Aptamer by ¹⁹F NMR. // *ACS Omega.* 2017. Vol. 2. P. 8843–8848.
123. Ida R., Wu G. Direct NMR Detection of Alkali Metal Ions Bound to GQuadruplex DNA. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130. P. 3590–3602.
124. Steinert H. S., Rinnenthal J., Schwalbe H. Individual Basepair Stability of DNA and RNA Studied by NMR-Detected Solvent Exchange. // *Biophys. J.* 2012. Vol. 102. P. 2564–2574.
125. Jaroszewski J. W., Clausen V., Cohen J. S., Dahl O. NMR Investigations of Duplex Stability of Phosphorothioate and Phosphorodithioate

DNA Analogues Modified in Both Strands. // *Nucleic Acids Res.* 1996. Vol. 24. P. 829–834

126. Vorlickova M., Kejnovska I., Bednarova K., Renciuik D., Kypr J. Circular Dichroism Spectroscopy of DNA: From Duplexes to Quadruplexes. // *Chirality.* 2012. Vol. 24. P. 691–698.

127. Sorkin, A., & von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(9), 609–622. doi:10.1038/nrm2748

128. De Angelis Campos A. C., Rodrigues M. A., de Andrade C. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2011. Vol. 412(2). P. 341–346.

129. Liccardi G., Hartley J.A., Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. // *Cancer Res.* 2011. Vol. 71. P. 1103-1114.