Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ОГЛОБЛИНА АННА МАКСИМОВНА

МУЛЬТИТАРГЕТНЫЕ ЭФФЕКТЫ G4-АПТАМЕРОВ И ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *IN VITRO*

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

Якубовская Марианна Геннадьевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕД	ЕНИЕ5			
ГЛАВ	А 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ13			
1.1	Особенности структуры ДНК- и РНК- G-квадруплексов14			
1.2	Локализация G-квадруплекс-образующих последовательностей в геноме17			
1.3	Функционирование G-квадруплексов в клетке			
1.3.1	Основы распознавания G-квадруплексов белковыми молекулами20			
1.3.2	Влияние белков клетки на конформационные переходы в области G4-мотивов			
	22			
1.3.3	Белки, распознающие G-квадруплексные структуры			
1.4	G4-распознающие белки, рассматриваемые в качестве белков-мишеней при			
онкоза	болеваниях			
1.4.1	Ингибирование топоизомеразы I G4-аптамерами			
1.4.2	Ингибирование SHP2 фосфатазы G- богатыми олигонуклеотидами			
1.4.3	Ингибирование транскрипционного фактора STAT3 G-богатыми			
олигонуклеотидами				
1.4.4	Ингибирование транскрипционного фактора SP1 G-богатыми			
олигон	нуклеотидами			
1.4.5	Ингибирование фактора роста эндотелия сосудов VEGF G-богатыми			
олигон	нуклеотидами			
1.4.6	G4-распознающий белок нуклеолин			
1.5	Разработка аптамеров к целевым G4-распознающим белкам40			
1.5.1	Создание G4-аптамера к нуклеолину41			
1.5.2	Результаты клинических испытаний AS141143			
1.5.3	Проблема плейотропности при создании G4-аптамеров44			
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ				
2.1 Список использованных в работе реактивов				
2.2 Культивирование клеток				

2.3 Определение интоток силиости с помощи ю MTT теста 17
2.5 Определение цитотоксичности с помощью мтт-теста47
2.4 Выделение плазмидной ДНК49
2.5 Круговой дихроизм50
2.6 Трансформация компетентных клеток Е. Coli
2.7 Инфицирование псевдовирусными частицами51
2.8 Изучение влияния G4-аптамеров на биосинтез ДНК
2.9 Оценка уровня ингибирования топоизомеразы I52
2.10 Изучение влияния G4-аптамеров на активность транскрипционного фактора
STAT353
2.11 Статистическая обработка результатов54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ55
3.1 Обоснование общей стратегии проведения исследования
3.2 Биоинформатический поиск G-богатых мотивов в геноме
3.2.1 Анализ существующих подходов биоинформатического скрининга G4-мотивов
в геноме человека
 в геноме человека

4.3 Ингибирование активности транскрипционного фактора STAT3	
4.4 Ингибирование топоизомеразы I	90
4.5 Ингибирующее действие G4 на синтез ДНК	90
4.6 Влияние на жизнеспособность клеток рака молочной железы	91
4.7 Анализ плейотропного эффекта G4-аптамеров	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106
ПРИЛОЖЕНИЕ	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время становится общепризнанным, что в процесс канцерогенеза вовлечены не только точечные, хромосомные и геномные мутации, но и различные события на уровне эпигенетической регуляции экспрессии генов, а также влияющие формирование альтернативных структур ДНК на В последовательностях, регулирующих экспрессию генов. G-квадруплексы (G4) представляют собой структурный элемент нуклеиновых кислот, участвующий в регуляции экспрессии генов и процессинга РНК. Данные структуры формируются гуанин-богатыми последовательностями нуклеотидов (G4-мотивами), которые широко распространены как в геноме, так и в транскриптоме клетки. В зависимости от алгоритма биоинформатического анализа, геном человека содержит от 375 000 до 560 000 G4мотивов. При этом их локализация свидетельствует о функциональной значимости таких последовательностей – в основном G4-мотивы расположены в горячих точках рекомбинации, областях теломер, в промоторных областях генов. Характер распространенности G4-мотивов в промоторных областях также не случаен – в основном они ассоциированы с пропролиферативными генами, в том числе онкогенами, промоторы же генов-супрессоров опухолевого роста обеднены G4мотивами. Было продемонстрировано, что формирование G4 в промоторах ряда онкогенов, способно существенно подавлять их экспрессию.

Регуляторная функция G4 осуществляется благодаря способности G4-мотивов ДНК в определенных условиях переходить из классической В-формы в форму G4. Известен целый ряд внутриклеточных белков и низкомолекулярных соединений, проявляющих повышенное сродство либо к сформированной структуре G4, либо к определенным последовательностям (G4-мотивам), способным формировать G4. Таким образом, стабилизация и дестабилизация G4 специфическими низкомолекулярными лигандами и G4-распознающими белками способна вносить изменения в профиль экспрессии генов за счет выключения G4-мотивов из тех динамических процессов, участие в которых определяет их функциональную роль *in vivo*. Однако выявление наиболее распространенных G4-мотивов по геному, определение групп генов, имеющих одинаковые G4-мотивы в своих промоторах, до настоящего времени не проводилось.

В исследованиях последнего десятилетия показано, что взаимодействие ряда ферментов с G4 может влиять на такие клеточные процессы как транскрипция (SP1, NMP1), трансляция (FXR1P, Pat1, hnRNP A), репликация (RecQ, Pif1), передача сигнала о повреждении ДНК (PARP1), рекомбинации (RecA). Учитывая повышенную активность перечисленных процессов в опухолевой клетке, а также их прямое влияние на пролиферацию и выживаемость опухолевой клетки, экзогенные гуанинбогатые олигонуклеотиды, способные формировать G4 (G4-аптамеры), рассматриваются в настоящее время как потенциальные противоопухолевые агенты.

Попадая в клетку, G4-аптамеры связываются с соответствующими ферментами и ингибируют их активность. Считается, что G4-аптамеры способны селективно связывать белок-мишень с высокой специфичностью и селективностью, что объясняется их особой пространственной конформацией. В настоящее время проводятся доклинические исследования и клинические испытания широкого ряда G4-аптамеров в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов. Разные G4аптамеры могут обладать схожими структурными детерминантами, что определяет потенциальную возможность взаимодействия G4-аптамера не только с «целевым» белком, к которому он был разработан, но и какими-либо другими G4распознающими белками. Однако плейотропность действия G4-аптамеров до настоящего момента не изучали. Кроме того, не изучена избирательность действия большинства G4-аптамеров в отношении опухолевых клеток, что является важной характеристикой потенциального противоопухолевого препарата.

Таким образом, выявление наиболее часто встречающихся G4-мотивов и определение особенностей, формируемых ими G4, а также анализ плейотропности эффектов G4-аптамеров и избирательности их действия в отношении опухолевых

клеток представляется актуальной темой исследования в области экспериментальной онкологии и молекулярной биологии.

К настоящему времени получены многочисленные данные, подтверждающие функциональную роль G4 в клетке. Эти исследования приобрели большую значимость после серии работ, однозначно подтвердивших формирование G4 *in vivo* [1].

Функциональная роль G4 в регуляции многих клеточных процессов подтверждается наличием у широкого ряда белков способности связывать данные неканонические структуры. На данный момент известно более 60-ти G4-связывающих белков, многие из которых являются потенциальными или актуальными мишенями противоопухолевой терапии.

В настоящее время в качестве потенциальных ингибиторов целевых белков противоопухолевой терапии активно рассматриваются олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью связывать целевой белок, так называемые «аптамеры». Многие G4-аптамеры были разработаны к белкам, которые являются признанными мишеням противоопухолевой терапии:

- сигнальный белок и активатор транскрипции STAT3;

- топоизомераза 1 (TOP1), влияющая на уровень сверхспирализации ДНК;

- транскрипционный фактор SP1, который активирует экспрессию пролиферативных генов;

- тирозинфосфатаза SHP2, которая играет регуляторную роль в ряде клеточных процессов;

- ангиогенный фактор VEGF-A165;

- мультифункциональный белок нуклеолин, экспрессия которого повышена в опухолевых клетках.

Специфичность взаимодействия белков с G4 объясняется особым строением последних. Схожие структурные детерминанты G4 дают основание предположить,

что они могут распознаваться не только «целевым» белком, но и какими-либо другими G4-связывающими белками.

Цель исследования

Целью данного исследования является анализ особенностей функционирования G4-мотивов в геноме клетки и избирательности цитотоксического действия G4-аптамеров на опухолевые клетки.

Задачи исследования

1.Провести поиск наиболее распространенных в геноме G4-мотивов с помощью биоинформатического анализа базы данных human genome GRCh37/hg19 с определением локализации каждого G4-мотива (расстояние до сайта старта транскрипции, положение на кодирующей или матричной нити), и числа ассоциированных генов с наиболее распространенными G4-мотивами.

2.Оценить стабильность и конформацию формирования G4-мотивов, распознаваемых «целевыми» белками противоопухолевой терапии.

3.Провести анализ плейотропности действия ряда G4-аптамеров, разработанных с целью специфического ингибирования таргетных белков противоопухолевой терапии (по ингибированию STAT3 и TOP1).

4.Сравнить эффект отобранных G4-аптамеров на процесс репликации и жизнеспособность опухолевой (МСF-7) и условно-нормальной (МСF-10А) линий клеток молочной железы.

5.Провести анализ зависимостей биологических эффектов G-аптамеров от их структуры и физико-химических характеристик.

Научная новизна

В настоящей работе впервые показано, что одна и та же последовательность G4мотива может предшествовать более чем 20-ти различными генам.

На моделях *in vitro* опухоли молочной железы (линии опухолевых клеток MCF-7) и условно нормальной ткани молочной железы (линии иммортализованных клеток MCF-10A) продемонстрирована избирательность цитотоксического эффекта ряда G4аптамеров в отношении опухолевых клеток.

Впервые произведен перекрёстный анализ эффектов G4-аптамеров на процессы репликации, активность TOP1 и белка STAT3.

Впервые установлен плейотропный эффект G4-аптамеров – доказано, что они способны реагировать не только со своей мишенью, но также с рядом других G4-распознающих белков.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость представленной работы заключается в демонстрации факта взаимодействия G4-аптамера не только со своим целевым белком, но и с белками, обладающими сродством к структурам такого типа. До этого эффекты G4аптамеров, производимые на клетку рассматривали в связи с его влиянием на активность целевого белка. Однако, по результатам данной работы, подобное представление о механизме реализации влияния G4-аптамеров на биологические процессы в клетке, является не полным и требует дополнений. Так, установлено, что определённые G4-аптамеры способны ингибировать активность более чем двух белков в близких концентрациях. Это позволяет расширить существующие представления механизмах влияния G4-аптамеров 0 на внутриклеточные биологические процессы.

Практическая значимость работы обусловлена тем, что одним из направлений разработки противоопухолевых препаратов является поиск агентов, способных ингибировать одновременно несколько сигнальных путей, направленных на активацию пролиферации и ингибирование апоптоза. Клинические исследования показывают, что высокоселективное ингибирование лишь одного из сигнальных путей в опухолевой клетке, как правило, приводит лишь к ограниченному по времени ответу. При этом эффективность таргетной терапии значительно различается для пациентов, так как зависит от индивидуальных особенностей организма. Для

9

таргетной терапии существенной проблемой является приобретенная резистентность. Считается, что развитие резистентности обусловлено пролиферацией клона клеток, несущих мутации, отменяющие действие таргетного препарата.

В связи с этим объектом активных исследований стали потенциальные агенты мультитаргетной терапии, которые должны обладать общим структурным элементом, обуславливающим результативность воздействия терапевтического агента на определённый спектр целей.

Логичным представляется использование внутриклеточных механизмов кластерной регуляции функционирования генома с помощью G4 и G4-распознающих белков. Таким образом, практическое значение данного исследования связано с потенциальным использованием G-богатых олигонуклеотидов в качестве агентов мультитаргетной терапии.

Методология и методы исследования

В качестве методологических подходов при выполнении исследования использовали комплексный и системный анализ. В исследовании были применены современные физикохимические и молекулярно-биологические методы. В частности, для изучения физико-химических характеристик перехода В-ДНК в G4-форму были использованы: круговой дихроизм (CD), УФ-плавление, метод вытеснения флуоресцентного индикатора (FID). При изучении роли формирования G4 в регуляции экспрессии онкогенов были применены следующие молекулярно-биологические методы: q-ПЦР, клонирование, очистка и выделение ДНК и РНК, культивирование клеточных линий, трансдукция, трансфекция, исследование с использованые методами компьютерного анализа баз данных генома человека (human genome GRCh37/hg19). Результаты обработки полученных данных приведены как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD) или ошибкой среднего (SEM). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмагорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Статистическую обработку данных проводили

с использованием программного обеспечения Statistica10 (StatSoft, США). Были использованы t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони, различия считались статистически значимыми при p<0,05.

Положения, выносимые на защиту

- 1. В геноме существует более десяти наиболее распространенных G4-мотивов, каждая из этих последовательностей ассоциирована группой генов (более 20 генов в группе).
- Методами УФ-плавления и кругового дихроизма доказано формирование G4 олигонуклеотидами, разработанными в качестве ингибиторов целевых белков противоопухолевой терапии.
- 3. Ряд G4-аптамеров, разработанных с целью специфического ингибирования различных таргетных белков противоопухолевой терапии, способен в микромолярных концентрациях ингибировать STAT3 и TOP1, что свидетельствует о перекрестных взаимодействиях G4 и G4-распознающих белков в функционировании генома клетки, а также о плейотропности действия экзогенных G4-аптамеров.
- 4. Ряд G4-аптамеров из включенных в представленное исследование проявляют избирательность действия по антипролиферативному и цитотоксическому эффектам в отношении опухолевых клеток линии рака молочной железы МСF-7 в сравнении с иммортализованными клетками нормальной ткани молочной железы линии MCF-10A.
- 5. Анализ физико-химических характеристик биологически активных G4аптамеров свидетельствует о преимущественном формировании ими параллельных G-квадруплексов.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами исследований по экспериментальной онкологии, полученные автором новые данные согласуются с

научной отдельными литературе изучению имеющимися В данными ПО свойств гуанин-богатых биологических олигонуклетотидов. Достоверность полученных данных основана на адекватном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов анализа, полученные результаты обработаны с использованием адекватных методов математической статистики. По материалам диссертации было опубликовано 6 статей в зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК. Результаты исследования были представлены и обсуждены на конференциях: конференция работ молодых ученых «Ломоносов 2013» (8-12 апреля 2013, Москва, Россия), 58ая ежегодная конференция Биофизического Общества (15-19 февраля 2014, Сан-Франциско), VIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (13-17 марта 2014, Казань, Россия), VI Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (21-23 декабря 2021, Москва, Россия).

Диссертация апробирована 22.09.2021 на совместной конференции отдела химического канцерогенеза, отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории механизмов канцерогенеза.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Введение

Развитие новых подходов к терапии злокачественных новообразований требует создания агентов, способных селективно связываться с определенными белками и направленно ингибировать биологические процессы, обеспечивающие жизнеспособность и пролиферативную активность опухолевых клеток.

Одним из типов таких агентов являются аптамеры – короткие олигонуклеотиды, имеющие определенную пространственную конформацию. Они обладают рядом преимуществ по сравнению с другими используемыми ингибиторами целевых белков таргетной терапии злокачественных новообразований, а именно – возможностью быстрого синтеза и отбора в качестве ингибирующего агента к заданным мишеням, низкой иммуногенностью, низким молекулярным весом по сравнению с белковыми препаратами, и достаточно высокой стабильностью. Специфичность взаимодействия аптамеров с белками-мишенями обусловлена их особой пространственной способностью структурой, к электростатическим И ван-дер-ваальсовым взаимодействиям и к образованию водородных связей с функциональными группами молекулярной мишени.

Одной из пространственных структур, формируемых потенциальными противоопухолевыми аптамерами, являются G-квадруплексы (G4). Большое эндогенных G4 и G4-распознающих белков свидетельствует о количество существовании сложно организованной системы регуляции различных процессов, основанной на функционировании данной альтернативной структуры ДНК. Наличие в различных участках генома одних и тех же G4-мотивов, а также выявление схожих структурных особенностей различных G4, позволяют предположить возможность существования кластерной регуляции экспрессии основанной генов, на взаимодействии G4 с G4-распознающими белками. Однако регуляция функционирования генома с использованием данного механизма находится лишь на начальном этапе исследования и в настоящее время не является полностью изученной.

13

В представленном обзоре литературы описаны типы структур G4, выявленные механизмы функционирования подобных эндогенных структур в течение внутриклеточных процессов, описаны наиболее изученные G4-распознающие белки, представлена информация о существующих противоопухолевых G4-аптамерах. В частности, рассмотрены особенности структуры, механизм действия и особенности разработки наиболее известных G4-аптамеров, потенциальное использование которых в качестве противоопухолевых агентов представляется перспективным.

1.1 Особенности структуры ДНК- и РНК- G-квадруплексов

G4 представляют собой четырехнитевые структуры нуклеиновых кислот, формируемые тандемными повторами коротких трактов гуанина – последовательностей в которых три и более гуанина располагаются последовательно один за другим. Способность олиго- и полигуанозинов агрегировать друг с другом была обнаружена еще в 1962 году с помощью рентгеноструктурного анализа [2]. Ключевым элементом структуры G4 является G-тетрада – 4 гуаниновых основания, которые образуют плоскую структуру, удерживаемую Хугстеновскими водородными связями (Рисунок 1).

В общем виде нуклеотидные последовательности, с высокой вероятностью складывающиеся в G4, можно описать формулой G3-5L1G3-5L2G3-5L3G3-5, где Ln – это последовательности, не входящие в G-тракты, и в сформированном G4, образующие внешние петли. Средняя длина петель варьируется в диапазоне от 1 до 7 нуклеотидов. Однако в некоторых случаях она может достигать большего значения, вплоть до 21 нуклеотидного остатка [3].



Рисунок 1 - Структурная организация G-тетрады [1]

Эта закономерность выполняется не всегда, и G-тракт может прерываться включениями других нуклеотидов, в этом случае ребра G4 имеют различные выпетливания.

Для G4 характерно большое структурное разнообразие, обусловленное такими переменными, как количество G-тетрад, ориентация, тип и длина петель [4].

В исследованиях *in vitro* G4 образовывались в результате межмолекулярных взаимодействий с участием четырех или двух олигонуклеотидов, содержащих G-тракты, а также за счет внутримолекулярного свертывания олигонуклеотидов (Рисунок 2).



Рисунок 2 - Различные типы структур G4 [4]

Внутри G-тетрады находится отрицательно заряженная полость, образованная карбонильными группами остатков гуанина, которая должна быть нейтрализована

взаимодействием с катионом. При этом стабилизационная способность катиона зависит от его размера. Показано, что ионы одновалентных металлов можно выстроить в ряд в соответствии с убыванием способности стабилизировать G4: K⁺> Rb⁺> Na⁺>Cs⁺>Li⁺[5], что объясняется различиями в размере катионов. Так, если ионы K⁺ располагаются между двумя тетрадами и образуют 8 координационных связей, Na⁺ взаимодействует лишь через 4 связи с каждой тетрадой и проявляет более слабый стабилизационный эффект. Наконец, ионы лития фактически неспособны к стабилизации G4 вследствие малых размеров.

На структуру G4 влияет весь комплекс условий – молекулярное микроокружение, степень гидратации ДНК, фланкирующие последовательности и т.д. [3, 6-10]. Многие G4-мотивы образуют или потенциально способны образовать не одну уникальную структуру, а набор из нескольких возможных структур. Поскольку эти варианты не имеют существенных различий в энергетике формирования, небольшие изменения условий дают преимущество одной или нескольким разным структурам.

Поскольку внутримолекулярные G4 для формирования требуют наличия одиночной свободной цепи ДНК, очевидна необходимость специфических условий, способствующих тому, чтобы В-форма ДНК (каноническая двойная спираль ДНК) стала энергетически менее выгодной. Это происходит в ходе репликации, репарации и транскрипции, когда единичные цепи двуспиральных молекул ДНК разделяются и в дальнейшем могут сформировать неканонические структуры, в том числе G4. Динамическое равновесие между В-ДНК и G4 смещается в сторону последнего в условиях отрицательной сверхспирализации [11].

В то время как G-богатые последовательности образуют G-квадруплексную структуру, комплементарная цепь, содержащая тракты олигоС, укладывается в, так называемую, четырехспиральную интеркаляционную ДНК (i-ДНК), стабилизированную неканоническими полупротонированными парами C≡C+; причем остатки цитозина в этих парах принадлежат параллельно-ориентированным цепям

[12]. Интеркаляционная ДНК образуется за счет взаимной интеркаляции двух параллельных дуплексов во взаимно-антипараллельной ориентации; при этом чередующиеся неканонические пары C=C+ лежат в разных плоскостях (Рисунок 3).



Рисунок 3 - Неканоническая полупротонированная пара С≡С+ и схематичное изображение i-ДНК, стабилизированной такими парами [12]

Способность складываться в G4 демонстрируют также и последовательности PHK, содержащие G-тракты. PHK-G4 также формируются за счет образования стэкинг-контактов [13]. Рибонуклеиновые G4 формируются в соответствии с теми же закономерностями, что и их ДНК-аналоги (значение концентрации ионов металлов, количество G-тетрад, длина и первичная структура выпетленных участков) и др. [14]. Особенность PHK-G4 заключается в абсолютном доминировании структуры параллельного типа, что можно обнаружить даже при широком варьировании параметров среды. По всей видимости, такое структурное предпочтение обусловлено стерическими ограничениями, вызванными присутствием 2'-OH группы в остатках гунозина. Также, сравнение ДНК- и PHK-G4, сложенных из одинаковых последовательностей, показало, что последние более стабильны [14].

1.2Локализация G-квадруплекс-образующих последовательностей в геноме

Геномы многих организмов обогащены G4-мотивами. В исследовании [15] были проанализированы геномы 13 различных животных на наличие G4-мотивов в областях, фланкирующих точку начала транскрипции. Установлено, что в большей

степени такими мотивами обогащены регуляторные районы генов теплокровных животных. По сравнению с геномом шимпанзе, регуляторные области генома человека чаще содержат G4-мотивы в регуляторных областях. Причем присутствие G4-мотивов удалось выявить в равной степени в регуляторных участках ранних и поздних генов.

Всего в человеческом геноме насчитывается около 375000 G4-мотивов [16]. Это число может значительно возрасти в зависимости от допущений, применяемых к последовательностям, которые можно считать G4-мотивами [17, 18]. При проведении биоинформатических исследований критерием отбора последовательностей в качестве G4-мотива служит наличие четырех G-трактов, содержащих по меньшей мере подряд три остатка гуанозин-5'-фосфата, разделенных последовательностями разной длины, т.е. соответствие алгоритму: $G_nN_{1-7}G_nN_{1-7}G_n$, где $n \ge 3$, N = A, T(U), G, C. Однако в последние годы было показано, что ряд олигонуклеотидов, несмотря на отклонения от этого правила тоже образуют стабильные G4 [19-21].

В эукариотах ДНК упакована в нуклеосомы, что мешает образованию неканонических структур, в том числе и G4. Компьютерный анализ геномов *Saccharomycescerevisiae, Caenorhabditiselegans* и человека показал, что G4-мотивы преимущественно расположены вне районов, вовлеченных в образование нуклеосом [22, 23]. G4-мотивы были выявлены в регуляторных областях генома, в частности, в промоторах генов (Рисунок 4) [24-26], в микросателлитных повторах, [27, 28], в теломерных повторах [29], в генах рибосомных РНК; [30] в участках, ответственных за перегруппировку генов иммуноглобулинов, участках повышенной ломкости хромосом, [31] в горячих точках рекомбинации [32], интронах генов, в длинных концевых повторах ретротранспозонов [33-35], а также в различных областях транскриптома, включающих участки альтернативного процессинга мРНК [16], а также 5'- и 3'-нетранслируемые районы мРНК [36].

Плотность распределения G4-мотивов по геному человека составляет 0,153 на тысячу пар оснований, в то время как их содержание составляет в промоторах генов

1,48. Максимум на кривой вероятностного распределения G4-мотивов соответствует участку, находящемуся на расстоянии примерно 50 пар нуклеотидов от точки начала транскрипции (Рисунок 4). Это было показано для геномов человека, мыши, крысы, дрожжей, *E.coli* [37].



Расстояние до(-) и после(+) сайта старта транскрипции

Рисунок 4 - Идентификация G4-мотивов в области промоторов генов с использованием вычислительного анализа по методу Quadparseralgorithm. Данные усреднены по всем генам генома человека. Синим цветом указана кривая для последовательностей, образующих G4, красным – кривая для С-богатого і-мотива, комплементарного G4-мотиву. За нулевую точку принят сайт начала транскрипции [37]

G4-мотивы распределены неравномерно по промоторным участкам всех генов: в основном они сопряжены с генами, продукты которых отвечают за регуляторные функции, а не вовлечены в биосинтез белков «домашнего хозяйства» [38]. В основном G4-мотивы предшествуют онкогенам, а гены-супрессоры опухолевого роста обеднены такими последовательностями [39]. Подобное расположение говорит о функциональной значимости этих структур в функционировании генома.

1.3 Функционирование G-квадруплексов в клетке

К настоящему времени формирование G4 *in vivo* однозначно доказано как с применением антител высокоспецифичных к G4, так и флуоресцентных высокоспецифичных лигандов к G4 [1].

Широкое распространение G4 в геноме объясняет существование в клетке целого ряда белков, функционирование которых связано с распознаванием данной альтернативной структуры. Особая пространственная конформация G4 обеспечивает специфичность взаимодействия белков с такими структурами.

1.3.1 Основы распознавания G-квадруплексов белковыми молекулами

Белки и ферменты, обладающие повышенным сродством к G4 по сравнению с двуспиральными или одноцепочечными ДНК, также обладают различным сродством к различным типам G4-структур [40].

Несмотря на активное изучение комплексов белков с G4, структурные основы их распознавания белковыми молекулами остаются неясными, и исследования в этой области носят фрагментарный характер. Методом ЯМР высокого разрешения установлено, что на белково-нуклеиновое взаимодействие влияют петли G4 [41] и сочленение дуплексных и квадруплексных доменов в альтернативной конформации ДНК [42, 43].

Ключевым элементом белковой структуры, который обеспечивает связывание с G4, считают аргинин/глицин богатый RGG домен [44]. Он отвечает за распознавание G4 у широкого ряда G4-распознающих белков – нуклеолин, EWS (Ewing sarcoma protein), TLS, FMRP и многие другие (Таблица 1).

20

Таблица 1 – примеры аминокислотной последовательности доменов, отвечающих за распознавание и связывание G4 [44]

Название белка	Аминокислотная последовательность
MRE11	RGGRGQNSASRGG
ROA0	RGGNFSGRGGFGGSRGG
G3BP1	RGGLGGGMRGPPRGG
SFPQ	RGGGGGFHRRGGGGRGG
hnRNP D0	RGGFAGRARGRGG
RB56	RGGYRGRGGFQGRGG
DDX4	RGGRGSFRGCRGG
SPRN	KGGRGGARGSARGGVRGG
FA98A	RGGHEQGGGRGGRGGYDHGGRGG
hnRNP U	RGGGHRGRGGFNMRGGNFRGGAPGNRGG
CIRBP	RGGSAGGRGFFRGGRGRGRGFSRGG

Важную роль в узнавании теломерных G4 RCC-доменом играют ароматические аминокислоты – тирозин и фенилаланин [45]. Остатки фенилаланина исключительно важны для специфического связывания с G4. Так, замена трех фенилаланинов на остатки аланина лишает пептид возможности связывать квадруплексные структуры. При этом, если заменить остатки фенилаланина на тирозин, который обладает большей гидрофильностью, такой замещенный пептид узнает и связывает преимущественно PHK-G4.

Существуют и другие белковые домены, способные связывать G4. Недавнее исследование кристаллической структуры комплекса белок-ДНК показало, что N-концевой мотив и олигонуклеотид-связывающий домен геликазы DHX36 обеспечивает способность белка DHX36 распознавать и связывать G4 [46].

С помощью молекулярного моделирования показано, что по размерам G4 точно соответствует полости интегразы ВИЧ-1 и белка RecA [47], а нуклеофосмин взаимодействует как с G4, так и спиральным фрагментом ДНК [48]. Недавно методом

ЯМР-спектроскопии было показано, что две молекулы пептида, последовательность которых соответствует фрагменту Р16 прионного белка PrPC, связываются с внешними G-тетрадами PHK-G4 за счет гидрофобных взаимодействий [49]. В 2015 г. с помощью этого же метода была идентифицирована 18-звенная G4-связывающая аминокислотная последовательность PHK-хеликазы RHAU, которая «покрывает» внешнюю G-тетраду параллельного ДНК-G4 и охватывает квадруплексный кор за счет электростатических взаимодействий между тремя положительно заряженными аминокислотами и отрицательно заряженными фосфатными группами [50]. Примечательно, что эта модель связывания аналогична описанной для большинства G4-специфичных низкомолекулярных лигандов.

1.3.2 Влияние белков клетки на конформационные переходы в области G4-мотивов

Регуляторные функции G4 в клетке могут осуществляться только при участии белковых факторов, которые модулируют их термодинамическую стабильность и конформацию. Локальные конформационные переходы между В-формой и G4 реализуются при участии различных внутриклеточных ферментов [51-53]. Нарушение процесса регуляции конформационного состояния ДНК препятствует транскрипции, репликации, [54, 55] репарации, гомологичной рекомбинации ДНК и поддержанию стабильности длины теломер. Данные нарушения приводят к двухцепочечным разрывам, геномных перестройкам, экспансии G-богатых повторов [56–58].

Особое место среди белков, специфически связывающих и разворачивающих G4 структуры, занимают хеликазы, которые предотвращают геномную нестабильность, вызываемую G4-мотивами [58, 59]. Белки этого семейства распознают G4 и «расплетают» их, переводя в форму В-спирали. При этом процесс может как зависеть, так и не зависеть от гидролиза макроэргических связей молекулы ATФ. Механизм и кинетика разрешения G4 хеликазами семейства Pifl в процессе репликации обсуждены в работах [60–62]. В отличие от высокопроцессивной активности, показываемой хеликазами Pifl, которые остаются связанными со своим

ДНК-субстратом, G4-резольваза 1 (известная также как DHX36 или RHAU), способная прочно связывать и разрешать ДНК-G4 и PHK-G4, является непроцессивной, так как отделяется от субстрата после каждого акта гидролиза ATФ [63]. Разворачивание внутримолекулярных G4 ATФ-зависимой ДНК-хеликазой BLM из семейства RecQ, как показано методом FRET на единичных молекулах, осуществляется посредством различных механизмов в зависимости от структурного окружения G4 [64].

В прикладном плане интерес к G4 значительно вырос из-за комплекса уникальных свойств, которые могут быть востребованы в нанотехнологии и медицине [65-67]. Влияние G4 на регуляцию физиологических (или патологических) процессов с равным успехом можно рассматривать в двух направлениях:

- G4 рассматривают в качестве мишеней лекарственных средств, создаваемых на основе низкомолекулярных соединений. Известно, что стабилизация G4 в промоторах онкогенов специфическими низкомолекулярными лигандами способна вносить изменения в профиль экспрессии генов за счет образования механической преграды для полимераз и препятствий для связывания с факторами транскрипции, а также выключения G4-мотивов из тех динамических процессов, участие в которых определяет их функциональную роль *in vivo*;

- второй подход заключается в разработке лекарств на основе G4олигонуклеотидов. Возможность участия G4 в биологических процессах обусловлено наличием функционально важных белков, которые специфически связываются с этими структурами, что служит сигналом к модуляции активности фермента. К настоящему времени открыто и охарактеризовано множество белков и ферментов, обладающих повышенным сродством к G4. Экзогенные G4-олигонуклеотиды, искусственно внесенные в клетку могут служить «молекулярными ловушками» для таких ферментов – связываясь с G4, фермент перестает функционировать. Таким образом, введение в клетку экзогенных G4-аптамеров приводит к нарушению регуляции процессов, в которых участвуют эндогенные G4. Кроме того, отдельно стоит отметить, что в отличие от других вторичных структур нуклеиновых кислот, G4 устойчивы к действию эндонуклеаз, что обеспечивает их продолжительную циркуляцию в плазме крови [68, 69].

1.3.3 Белки, распознающие G-квадруплексные структуры

Белки, узнающие G4, принадлежат к разным классам и выполняют различные функции в клетке: участвуют в регуляции длины теломер, в сборке рибосом, [70] в процессах транскрипции [253], трансляции, сплайсинга или альтернативного сплайсинга, [71-75] в репликации и репарации ДНК, [76, 249], в репликации ДНК пониженной точности через поврежденные нуклеотидные звенья, [77] в обратной транскрипции [78], взаимодействии гомологичных хромосом во время мейоза, и изменении топологического состояния ДНК [251, 252].

К настоящему времени детально охарактеризован целый ряд белков, обладающих повышенным сродством к G4 (Таблица 2).

Участие в биологическом процессе	Белок	Ссылка
	Rap1	[79, 80]
	Pot1	[81, 82]
	BRCA1	[83]
	hnRNP D	[84]
Поддержание стабильности теломер	RPA	[85, 86]
	TLS/FUS	[87]
	TRF2	[88]
	hnRNPA1	[89]
	TEBPs	[90, 91]
	UP1	[92]
	TOP1	[93]

Таблица 2 - G4-связывающие белки

Участие в биологическом процессе	Белок	Ссылка
	C23(nucleolin)	[40, 94]
	PARP1	[95]
	CNBP	[96]
	Nucleophosmin	[97]
Транскрипция	MAZ	[98, 99]
	MutSα	[100]
	IGF-2	[101]
	Insulin	[102]
	Mutant p53 protein	[103]
	p43	[104-106]
	FMR2	[107, 108]
	hnRNP A2	[109, 110]
Тронондинд	RHAU	[111]
Грансляция	Ribosomal proteins	[112]
	SRSF 1 and 9	[112, 113]
	TLS	[87]
	TRF2	[114]
	SRSF 1 and 9 [TLS [TRF2 [Семейство белков HIM-3 (HORMAD1) [[115-117]
	MRE11	[118]
Гомологичная рекомбинация и	Хеликазы RecQ (включая WRN и BLM)	[119]
хеликазы	FANCJ	[55]
	G4R1/RHAU	[120]
	Sgs1	[121]
	Dna2	[122]

1.4 G4-распознающие белки, рассматриваемые в качестве белковмишеней при онкозаболеваниях

Очевидно, что особая пространственная структура G4 может быть распознана широким рядом внутриклеточных белков. Это служит основанием для применения подхода рационального дизайна при разработке аптамеров к белкам-мишеням. В последующих подразделах будет представлен обзор белков-мишеней терапии онкологических заболеваний или белков-потенциальных мишеней, активность которых подавляется G4-аптамерами – их функции в процессе канцерогенеза, существующие терапии, в основе которых лежит ингибирование данных белков, а также механизм взаимодействия с G4-структурами.

1.4.1 Ингибирование топоизомеразы I G4-аптамерами

Этот фермент впервые был описан Джеймсом Вэнгом в 1970 году, как белок Escherichia coli, способный снимать отрицательную сверхспирализацию ДНК путем двухстадийной реакции [123]. На первой стадии реакции фермент вносит разрыв в сахарофосфатный остов одной из цепей дуплекса ДНК и ковалентно связывается с образующимся 3'-OH-концом биополимера. Поммиер и соавторы называли образуемый на первой стадии комплекс белка с ДНК «шарнирным анкером», который позволяет снять сверхспирализацию, и после удаления отрицательных сверхвитков и релаксации ДНК создает условия для второй стадии ферментативной реакции – восстановления сахарофосфатного остова ДНК (Рисунок 5).



Рисунок 5 - Схематическое изображение механизма действия ТОР1 [123]

Именно из-за своей способности менять топологию молекулы ДНК данный фермент получил свое название «топоизомераза». После открытия другого фермента, также снимающего сверхспирализацию ДНК, но с разрывом обеих цепей дуплекса, охарактеризованный ранее белок стали называть топоизомеразой I (TOP1). Было установлено, что этот фермент обладает повышенной аффинностью к однонитевой ДНК. Дальнейшее изучение особенностей функционирования TOP1 позволило сделать вывод о ее ключевой роли в целом ряде жизненно важных для клетки процессов, включая репликацию, транскрипцию и репарацию ДНК.

Опухолевая клетка постоянно делится, а значит синтез ДНК происходит в ней непрерывно, что требует разрешения возникающих топологических проблем. При ингибировании активности TOP1 в клетке наступает «топологический коллапс», и клетка уходит в апоптоз.

ТОР1 гиперэкспрессирована в клетках многих типах опухолей и является мишенью целой группы противоопухолевых препаратов, успешно применяемых при лечении гемобластозов, мелкоклеточном раке легких и ряде других онкологических заболеваний [124, 125].

Оказалось, что TOP1 способна распознавать различные неканонические формы ДНК, такие, как структуры Холлидея и G4. Было установлено, что аффинность TOP1 к однонитевой ДНК, образующей G4, значительно превышает соответствующую характеристику фермента в отношении олигонуклеотидов рэндомной последовательности [93, 126, 127].

В отличие от других альтернативных структур ДНК, G4 способны ингибировать активность TOP1. Этот феномен может быть объяснен связыванием образующегося G4 активным центром TOP1, что приводит к инактивации фермента. Так в работе [128] мутантный белок TOP1 с заменой тирозина на фенилаланин в активном центре не способен связываться с G4 и стабилизировать их.

Более того, TOP1 способствует складываю тетрамолекулярных G4 из олигонуклеотидов, содержащих по крайней мере 5 гуаниновых оснований подряд (причем этой способности не наблюдается ни у других ферментов, таких как Топоизомераза II, БСА, гистон H2A, ни у инактивированной TOP1 (подвергшейся предварительному инкубированию при 90 °C в течение 20 минут) [126]. Способность TOP1 служить своеобразным шапероном для G4 подтверждают и данные работы [93],

в которой обнаружено, что она способствует раскрытию 69-звенного дуплекса с образованием стабильного межмолекулярного G4.

Способность TOP1 преимущественно связываться с G4, открывает возможность влиять на активность фермента путем введения экзогенных G4-олигонуклеотидов, которые будут ингибировать активность TOP1. Необратимое связывание TOP1 с такими олигонуклеотидными «ловушками» выводит фермент из сферы реакции, что проявляется в ингибировании его активности.

В работе [127] было изучено влияние различных вариантов G4 со структурой типа «кресло» на способность ингибировать активность фермента. Было показано, что наибольшим ингибирующим эффектом обладают последовательности, которые фланкированы дуплексобразующими фрагментами. Причем наиболее благоприятная для ингибирования длина фрагмента дуплекса составляет 6 пар нуклеотидов [127].

В работе [93] анализировали влияние олигонуклеотидов (GGGGGT)₄, (GGGT)₄ и рэндомной последовательности на активность TOP1. Авторы оценивали активность фермента TOP1 по расщеплению синтетического ДНК-дуплекса, содержащего высокоспецифичный сайт, распознаваемый данным ферментом. С помощью такого методического подхода было показано, что (GGGGGT)₄ был в 3 раза более эффективным ингибитором TOP1, чем (GGGT)₄, и в 81 раз – чем олигонуклеотид рэндомной последовательности, что подтверждает версию влияния количества гуанинов в G-тракте на активность фермента.

Результаты проведенных исследований [129] показывают принципиальное влияние количества гуанинов в G-тракте олигонуклеотида на ингибирующую активность олигонуклеотида. Так увеличение числа гуанинов в G-тракте с двух до трех снижало в 10 раз количество олигонуклеотида необходимого для достижения одинакового ингибирующего действия. Примечательно, что полуингибирующая концентрация (IC50) для G4, описанного в этой работе составляло 0,08±0,01 µM, что значительно ниже IC50 наиболее применяемого в клинической практике ингибитора TOP1 – камптотецина.

1.4.2 Ингибирование SHP2 фосфатазы G- богатыми олигонуклеотидами

SHP2 – фермент, принадлежащий классу тирозиновых фосфатаз, является сигнальной молекулой, участвующей в регуляции множества процессов, таких как клеточное деление, дифференцировка, прохождение митотического цикла. Данный белок состоит из двух SH2-доменов (N-SH2, C-SH2) и каталитического PTP домена, С-конца с двумя сайтами фосфорилирования тирозинов (Y542 и Y580) и пролин-[130]. норме богатой области В активность SHP2 подавлена за счет внутримолекулярного взаимодействия между каталитическим PTP доменом и N-SH2 доменом. При связывании SH2 доменов с рецепторами факторов роста или адапторным белком (осуществляющим связь рецепторов с нижележащими ферментами сигнальных путей), SHP2 активируется и фосфолирирует нижележащие по каскадной цепи сигнальные белки [131]. Повышенная активность SHP2 ведет к постоянной активации различных сигнальных путей, среди которых Ras/Erk, PI3K-Akt, Ras-MAPK, Jak-STAT, и другие [132]. Мутации в N-SH2 домене SHP2 приводят к нарушению автоингибирования, что в конечном итоге ведет к перманентной активации SHP2 [132, 133]. Также важно отметить, что SHP2 регулирует передачу сигнала от (PD-1) – рецептора, запускающего запрограммированную клеточную гибель, и участвует в модуляции прохождения точки иммунного контроля.

SHP2 рассматривается как потенциальная мишень терапии опухоли при большинстве типов лейкозов, включая детский лейкоз, а также при некоторых типах нейробластом, меланом, раков легкого, груди [134].

Активно ведется поиск ингибиторов SHP2, в настоящий момент только один из них (TNO155) проходит вторую фазу клинических исследований на безопасность [135].

В работе Джи Ху и соавторов [136] методом SELEX был отобран аптамер, имеющий высокую афинность к SHP2, обладающий следующей гуанин-богатой последовательностью:



Рисунок 6 - кривая кругового дихроизма аптамера к SHP2 и его мутантного аналога, у которого отсутствует один из G-трактов [136]

Также было доказано мономолекулярное строение данного G4-аптамера при помощи метода УФ-плавления: так как при разных концентрациях температура плавления не менялась и составила 58°C, структура обладает внутримолекулярным фолдингом (Рисунок 7).



Рисунок 7 - кривые УФ-плавления аптамера к SHP2, подтверждающие его мономолекулярную структуру (длина волны 295нм) [136]

Константа диссоциации комплекса с ферментом составила 11 ± 4 нМ. Важно отметить, что аффинность этого аптамера к SHP2 более чем в 2 раза превышает аффинность всех известных атамеров к данному белку. [136, 137] Ингибиторная способность G4-аптамера на два порядка выше альтернативных ингибиторов SHP2 известных на данный момент: значение IC₅₀ составляет 29 нМ тогда так остальные известные соединения проявляют ингибиторный эффект лишь при микромоляных концентрациях. При этом, белок распознает именно G-квадруплексную структуру апатмера, а не последовательность ДНК, так как в отсутствии ионов K⁺, обеспечивающих складывание G4-структур, фермент терял сродство к этому олигонуклеотиду. При помощи техники спектроскопического измерения сил взаимодействия между единичными молекулами (Single-Molecule Force Spectroscopic Studies) была определена сила связывания аптамера с SHP2: в отсутствие ионов K⁺ -42,0 пH, что примерно на 50% меньше, чем в присутствии K⁺, 61,7 пH. Это подтверждает, что стабильность вторичной структуры G4 важна для связывания с SHP2. [138]

1.4.3 Ингибирование транскрипционного фактора STAT3 G-богатыми олигонуклеотидами

Семейство транскрипционных факторов STAT (1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) служит ключевым звеном в цепи передачи ряда митотических сигналов и играет важную роль в регулировании различных клеточных процессов, включая пролиферацию, клеточную дифференциацию, апоптоз и злокачественную трансформацию. В отсутствие специфической стимуляции STAT белки неактивны и локализованы в цитоплазме [139-141]. Активация белков этого семейства происходит за счет фосфорилирования тирозиновых остатков, что открывает возможность к их димеризации, то есть переходу в транскипционно- активную форму.

Белки данного семейства включены в один из наиболее активных пролиферативных сигнальных путей в клетках онкологических новообразований -JAK-STAT сигнальный путь (Рисунок 8). Он активирован в опухолевых клетках при ряде злокачественных новообразованеий: лейкозах, раке молочной железы, толстой кишки, предстательной железы [139].



Рисунок 8 - Схема JAK-STAT сигнального пути [139]

Гиперактивность STAT3 характерна для многих типов опухолей человека, в том числе для ряда опухолей системы крови, рака молочной железы, рака предстательной железы и других [142]. Данный белок является звеном в передаче митотического сигнала, активируемого в ответ на воздействие более чем сорока различных эндо- и экзогенных сигналов, например IL-6, IL-10, IL-11, EGF, FGF, VEGF и другие [143]. Он влияет на транскрипцию широкого ряда генов, вовлеченных в процесс прогрессии опухоли таких, как гены блокаторов апоптоза (Bcl-xL [144], Mcl-1, сурвирин), активаторов ангиогенеза (VEGF [145], белков, способствующих метастазированию [146], ингибиторов иммунных противоопухолевых ответов [147]. Для многих видов злокачественных заболеваний повышенный уровень конституционно активного STAT3 связан с плохим прогнозом [148].

Ингибитор STAT3, малая молекула OPB-31121, показавшая свою эффективность, в настоящий момент прошла первую фазу клинических испытаний, показав терапевтический потенциал стратегии ингибирования STAT3 [149].

К настоящему времени была обнаружена способность G-богатых олигонуклеотидов ингибировать активность STAT3 в микромолярных значениях. Так в клеточных линиях рака простаты LNCaP и PC-3 олигонуклеотид T40214 с последовательностью (GGGC)₄ подавлял способность белка STAT3 связываться с ДНК в микромолярных концентрациях, IC50 составила 3µM. [150]

Методами компьютерного моделирования получена предположительная структура комплекса G4 со STAT3. В полученной структуре G4, образованный симметричной последовательностью (GGGT)₄ встраивается в структуру ДНКсвязывающего димера STAT3 между двумя SH2-доменами (Рисунок 9). Кроме того, была показана избирательность G4-олигонуклеотидов по отношению к STAT3 по сравнению с другими белками этого семейства [151].



Рисунок 9 - Структура комплекса STAT3 и олигонуклеотида (GGGT)4, полученная методом компьютерного моделирования [152]

Олигонуклеотид T40214 с последовательностью (GGGC)₄ подавлял активность STAT3, блокируя его фосфорлирирование. Это препятствовало его димеризации и транслокации в ядро. T40214 полностью ингибировал экспрессию белков, контролируемых p-STAT3, включая Bcl-2, VEGF и Cyclin D1 в опухолях предстательной железы. Как следствие подавления активности STAT3, данный аптамер вызывал апоптотическую клеточную гибель и арест пролиферативного клеточного цикла. [150]

Для увеличения эффективности доставки G4-аптамера, был использован подход формирования комплекса на основе PEI (Polyethylenimine) – это позволило добиться доставки более 70 % аптамеров внутрь клеток опухоли предстательной железы. Это приводило к значительному уменьшению митохондриального потенциала и усилению апоптоза по сравнению с клетками, обработанными комплексом PEI с олигонуклеотидом случайной последовательности. [150]

На модели ксенографтов рака предстательной железы комплекс T40214/PEI показал эффективность в качестве ингибитора прогрессии опухоли, а также увеличивал выживаемость животных (рисунок 10). Так размер опухоли, у мышей, получавших T40214/PEI уменьшился с 91 до 55мм³ (p = 0,0002), в то время как размер опухоли у мышей, получавших паклитаксел, увеличился с 71 до 672 мм³ (p = 0,004). Лечение T40214 / PEI существенно продлевало продолжительность жизни животных: для группы, получавшей паклитаксел она составила 18 дней, и 100% мышей из группы T40214/PEI прожили дольше чем продолжительность эксперимента (24 дня). [150, 153]



Рисунок 10 – Влияние комплекса Т40214/РЕІ на рост у бестимусных мышей (Balb-nu/nu, четыре недели, вес ~20 г) ксенографтов аденокациномы предстательной железы человека [153]

1.4.4 Ингибирование транскрипционного фактора SP1 G-богатыми олигонуклеотидами

SP1 является фактором транскрипции, который в ответ на физиологические и патологические стимулы активирует или подавляет экспрессию широкого ряда генов, вовлеченных в различные процессы, такие как рост клеток, апоптоз, дифференцировка и иммунный ответ. Он служит финальным звеном многих пролиферативных сигнальных путей: RAS-ERK, WNT-путь, MAPK-путь, PI3K-AKT [154].

SP1 гиперэкспрессирован в ряде злокачественных опухолей, включая рак молочной железы, желудка, поджелудочной железы, легких, мозга (глиомы) и

щитовидной железы [155-158]. Как в модельных экспериментах на животных, так и в клинических образцах, уровень SP1 коррелирует с уровнем злокачественности опухоли, ее инвазивным потенциалом и способностью к метастазированию. Высокие уровни экспрессии SP1 связаны с плохим прогнозом для пациентов [159, 160].

Исследования, направленные на поиск и применение ингибиторов SP1 в терапии опухоли, продемонстрировали эффективность данного подхода [161-164]. Однако, несмотря на эти исследования, специфические ингибиторы Sp1 еще не вошли в клиническую практику.

Консенсусной последовательностью SP1 является «GGGGCGGGGGC» последовательность, повторяющаяся несколько раз. [165]. Этот повтор идеально совпадает с классическим мотивом, способным формировать G4 (G>3N1-7G>3N1-7G>3N1-7G>3N1-7G>3). Кроме того, присутствие мотива цинкового пальца SP1 также указывает на способность данного белка взаимодействовать с G4, так как в ряде работ продемонстрирована способность цинковых пальцев распознавать и связывать G4 [166].

Предположение о способности SP1 связываться с G4 было подтверждено в экспериментах in vitro – данный фермент распознавал как параллельные, так и антипараллельные и смешанные типы G4 [167]. Продемонстрирована способность SP1 образованным гена c-KIT (5'связываться G4, промотором С GGCGAGGAGGGGGGGGGGGC-CGGC-3') с наномолярным значением константы диссоциации $8,5 \pm 4,7$ нМ [73]. G4, формируемый промоторным участком гена VEGF, также распознается SP1 [168]. Продемонстрировано, что G4 могут выступать в роли молекулярных «ловушек», подавляющих транскрипционную активность SP1 [169, 170].

1.4.5 Ингибирование фактора роста эндотелия сосудов VEGF G-богатыми олигонуклеотидами

VEGF (Vascular endothelial growth factor) представляет собой сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования васкулогенеза (образования
эмбриональной сосудистой системы) и ангиогенеза (роста новых сосудов в уже существующей сосудистой системе). Белки VEGF служат частью системы, отвечающей за улучшения циркуляции крови в областях с недостаточной подачей кислорода [171].

Синтез VEGF контролируют факторы транскрипции HIF. Факторы транскрипции HIF-1 α и HIF-1 β постоянно производятся организмом, однако фактор HIF-1 α при наличии кислорода чрезвычайно неустойчив. В анаэробных условиях его содержание резко возрастает и комплекс HIF-1 α /HIF-1 β стимулирует синтез и высвобождение белков VEGF. Далее циркулирующий во внеклеточной среде белок VEGF связывается с VEGF-рецептором на клетках эндотелия и активирует действие тирозинкиназы. Этот сигнал передается в ядро и инициирует деление эндотелиальных клеток, запускает таким образом ангиогенез (Рисунок 11).



Рисунок 11 - Ангиогенез под действием VEGF [171]

Опухолевые клетки способны активировать ангиогенез. Солидные опухоли исключительно зависимы от ангиогенеза, и поэтому ингибиторы VEGF являются эффективными лекарственными агентами в терапии солидных опухолей. Наиболее используемым в клинической практике ингибитором VEGF является Бевацизумаб, представляющий собой моноклональные антитела [172].

Этот препарат эффективен при различных солидных опухолях, включая рак ободочной кишки, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы [173]. Однако его применение связано с тяжелыми побочными эффектами, в том числе со стороны иммунной системы. Поэтому поиск неантительных ингибиторов до сих пор является актуальным направлением научных разработок.

Методом SELEX получен G4-образующий аптамер – Vap7, способный с высокой аффинностью связываться с рецептор-связывающим доменом VEGF [174]. Константа его диссоциации с VEGF₁₂₁ и VEGF₁₆₅ составила 1,1 нМ и 1,4 нМ соответственно, что почти в три раза ниже константы диссоциации VEGF₁₆₅ с бевацизумабом (4,5 nM) [175].

Его последовательность d(TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTAGA), складывается в стабильную G-квадруплексную структуру. На этой основе был сконструирован укороченный вариант этого олигонуклеотида Vap7 (V7t1), в котором сохранялись гуаниновые повторы, необходимые для образования G4. V7t1 также складывается в несколько структур G4 связывает VEGF-165 с наномолярными значениями Kd. Для дальнейшего увеличения аффинности аптамера, был разработан класс мутантов V7t1; из этих исследований лучшим выбранным аптамером был 3R02, имеющим в 16 раз большее высокое сродство к мишени, чем V7t1. Его константа диссоциации составила 300 пМ [174].

1.4.6 G4-распознающий белок нуклеолин

Одним из G4-распознающих белков является нуклеолин, представляющий собой многофункциональный фосфопротеин. Этот белок считается маркером пролиферативной активности клеток, так как его количество коррелирует со скоростью деления клетки: как правило, высокий уровень нуклеолина характерен для интенсивно делящихся клеток, таких как клетки опухолей [176, 177]. Гиперэкспрессия нуклеолина приводит к запуску механизмов, приводящих к прогрессии опухоли. Это

объясняется тем, что при гиперэкспрессии нуклеолина подавляется трансляция мРНК основного белка-супрессора опухолевого роста – p53, что приводит к уходу клетки от апоптоза и стимуляции клеточного деления [178].

Белок нуклеолин имеет различную клеточную локализацию, которая зависит от типа клетки: располагается преимущественно в ядрышках, но также в цитоплазме, ядре и на поверхности клеточной мембраны. Для опухолевых клеток характерно высокое содержание нуклеолина. Он расположен на внешней стороне клеточной мембраны, что делает трансформированную клетку более чувствительной к пролиферативным сигналам [179]. Так, нуклеолин гиперэкспрессирован на поверхности различных типов опухолевых клеток, однако практически не представлен на поверхности нормальных эпителиальных клеток молочной железы или нормальных В-клеток [180]. Хованессиан и соавторы обнаружили, что скорость деградации неядерного (цитоплазматического и мембранного) нуклеолина в 10 раз выше, чем нуклеолина, локализованного в ядре. Время полужизни неядерного нуклеолина составляет около 45 минут, по сравнению с более чем 8 часами для ядерного нуклеолина) [181]. Присутствие нуклеолина на клеточной мембране требует постоянной транскрипции и трансляции мРНК нуклеолина, а также гликозилирования белка [181]. Эти процессы активны в пролиферирующих клетках опухолей и эндотелия, но ИХ интенсивность значительно понижена В нормальных дифференцированных клетках [181].

Молекулы нуклеолина, локализованные на поверхности клеток, расположены кластерами в липидном слое клеточной мембраны и взаимодействуют с различными лигандами, включая факторы роста, вирусные и другие белки. Предполагается, что транслокация нуклеолина в мембрану из цитоплазмы происходит в ответ на митогенные стимулы. Далее связывание лигандов с поверхностным нуклеолином приводит к его кластеризации, которая запускает процесс его клеточного захвата, реализуемого с помощью актин- или кальций зависимого механизма [181, 182]. Таким

39

образом, поверхностный нуклеолин функционируют как медиатор внеклеточных сигналов [177, 183, 179].

Внутриклеточный нуклеолин вовлечен во многие клеточные процессы. В комплексе с другими белками нуклеолин участвует в регуляции экспрессии пропролиферативных генов [184], репликации и рекомбинации ДНК, процессинга рРНК, стабилизации мРНК, компактизации ДНК, запуске апоптоза [185]. Важной функцией нуклеолина является транспорт белков и низкомолекулярных соединений между внеклеточным пространством, цитоплазмой и ядром [186].

Многофункциональность нуклеолина достигается за счет многодоменной структуры, состоящей из гистонсвязывающего N-конца, четырех PHK-связывающих доменов (RDB) в центральной области, глицин- и аргинин-обогащенных доменов (RGG- и GAR-домены) на С-конце [187]. Вследствие своих функций, нуклеолин рассматривают в качестве перспективной терапевтической мишени для таргетной терапии меланомы, опухолей желудка, предстательной железы и других злокачественных новообразований [181, 188-190].

Установлено повышенное сродство нуклеолина к последовательностям, формирующим G4 [191]. Выявлено, что большинство нуклеолин-зависимых генов содержат в промоторе G4-мотивы, распознаваемые нуклеолином, в их число входит с-MYC, ki-RAS, Bcl2 и другие [40].

1.5 Разработка аптамеров к целевым G4-распознающим белкам

В отличие от других вторичных структур нуклеиновых кислот, G4 устойчивы к действию эндонуклеаз, что обеспечивает их продолжительную циркуляцию в плазме крови [68, 69]. Экзогенные G4-олигонуклеотиды, искусственно внесенные в клетку могут служить «молекулярными ловушками» для ферментов, обладающих способностью взаимодействовать с G4. Введение в клетку экзогенных G4-аптамеров приводит к нарушению регуляции процессов, в которых участвуют эндогенные G4. Так распознающие G4, как белки, В основном являются участниками пролиферативных процессов, возникла идея разработки противоопухолевых аптамеров на основе структуры G4. В настоящее время ряд G4-аптамеров, разработанных к определенным белкам, участвующим в регуляции пролиферации, проходят предклинические исследования и клинические испытания.

На данный момент два аптамера, формирующие G4, находятся на второй фазе клинических испытаний:

- 1. 15-ти звенный аптамер к тромбину NU172, предшественником которого являлся ТВА [192].
- Нуклеолин-связывающий аптамер AS1411 (второе название которого AGRO100), рассматриваемы как потенциальный противоопухлевый агент [193]. Данный препарат к настоящему моменту прошел вторую фазу клинических испытаний для пациентов с метастатическим раком почки [194].

1.5.1 Создание G4-аптамера к нуклеолину

На основе G4 был разработан эффективный ингибитор нуклеолина – ДНК-G4аптамер AS1411 (5'-GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'). AS1411 был антипролиферативной обнаружен путем скрининга активности среди олигонуклеотидов, а не методом SELEX, типичным для поиска аптамеров [193]. Его исследования начались с демонстрации противоопухолевых эффектов на клеточных линиях, а также моделях ксенографтов (рак почки, рак легких, рак молочной железы и рак поджелудочной железы) [193]. Повышенную избирательность As1411 к опухолевым клеткам обеспечивает гиперкспрессия нуклеолина на внешней поверхности клеточной мембраны опухолевых клеток [195]. Это свойство позволяет использовать As1411 в качестве компонента, повышающего избирательность действия, при создании систем доставки терапевтических препаратов на основе наночастиц [128, 196].

Несмотря на широкое изучение AS1411, точный механизм его действия все еще остается неопределенным. Точно установлено, что As1411 выступает в качестве

лиганда нуклеолина, ингибирует его активность и вызывает остановку клеточного цикла и апоптоз. [193, 194].

Установлено, что поглощение AS1411 опухолевыми клетками, в отличие от нормальных, происходит главным образом путем макропиноцитоза (актин- и лиганднезависимого механизма, при котором клетки «поглощают» окружающую среду и любые макромолекулы, которые она содержит) [197, 198]. Это хорошо согласуется с полученными в последнее время данными о более высоком уровне макропиноцитоза в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками [199]. При этом AS1411 дополнительно стимулирует макропиноцитоз в опухолевых клетках, но не в нормальных, что увеличивает селективное противоопухолевое действие аптамера [197, 198].

В нормальных клетках AS1411 может подвергаться лизосомальной деградации, тогда как в опухолевых клетках лизосомальная активность снижается. Селективное накопление AS1411 в опухолевых клетках объясняется как усиленным поглощением данного G4-аптамера, так и снижением его выведения из клеток.

В исследованиях *in vitro* на модели В-клеточной лимфомы установлено, что AS1411 также опосредованно блокирует активность таких «мишеней» нуклеолина как NFкВ и BCL2 [200, 201]. Многочисленные доклинические исследования, продемонстрировали эффективность AS1411 в качестве ингибитора роста опухоли [195, 202]. На ксенографтах, полученных из клеток рака почки A498, рака легкого SKMES и рака молочной железы MX1, показано, что внутривенное введение AS1411 задерживает рост опухоли [193].

Также AS1411 проявил синергический противоопухолевый эффект в комбинации с известными химиопрепаратами: так на модели ксенографтов рака поджелудочной железы было обнаружено усиление противоопухолевого эффекта гемцитабина (химиопрепарат, используемый для лечения поджелудочной железы и немелкоклеточного рака легкого в клинической практике) [193]. В комбинированной

терапии с доксорубицином AS1411 снижает выживаемость клеток диффузной Вклеточной лимфомы [180].

1.5.2 Результаты клинических испытаний AS1411

AS1411 является первым G4-аптамером, введенным в клинические испытания в качестве таргетного противоопухолевого препарата [200].

Компания Арtamera (США) запустила клинические испытания I фазы AS1411 (известного в то время, как AGRO100) на 17 пациентах с распространенными солидными опухолями в 2003 году. По результатам первой фазы клинических испытаний AS1411 при внутривенном введении в дозах от 1-40 мг/кг/день в течение от 4-х до 7 дней серьезных побочных эффектов не выявлено и препарат был признан безопасным. В 2005 году британская биотехнологическая компания Antisoma приобрела Aptamera и расширила исследования I фазы [NCT00881244], провела испытания фазы 2 AS1411 в качестве монотерапии у пациентов с карциномой почек [NCT00740441], а также использования AS1411 в комбинации с цитарабином в терапии пациентов с острым миелоидным лейкозом [NCT00512083]. Однако далее исследования AS1411 [NCT01034410] были прекращены в связи с остановкой деятельности компании. Права на препарат приобрела компания Advanced Cancer Therapeutics, переименовав его в ACT-GRO-777. На данный момент новой информации о результатах текущих клинических испытаниях препарата не появилось.

Все клинические испытания As1411 подтвердили его низкую токсичность и относительную безопасность для человека. В то же время использование субоптимальных доз препарата могут привести к низкой эффективности и ограничению его дальнейшего развития. Например, результаты исследования фазы II показали, что аптамер имеет быстрый клиренс (t¹/₂ = 1,71 ч [194]) и достигает максимальной концентрации в плазме (Cmax) равной 25,4 мкг / мл [194] (около 3 мкМ), тогда как значения IC50 для AS1411 находятся в диапазоне 1-10 мкМ для большинства опухолевых линий клеток. Следовательно, концентрация препарата

может быть достаточной для ингибирования только наиболее чувствительных к AS1411 опухолей. Тем не менее, 7 пациентов с почечно-клеточной карциномой и 4 пациента с острым миелоидным лейкозом имели длительные клинические ответы, их опухоли исчезли или значительно сократились в размерах. Молекулярные особенности опухоли ответчика были исследованы только для одного случая – у пациентки с метастатической почечной карциномой (RCC). У нее были обнаружены мутация в гене FGFR2 и активирующая мутация в гене mTOR [194], что особенно интересно, поскольку mTOR играет важную роль в макропиноцитозе и внутриклеточном транспорте [207].

Понимание механизма действия AS1411 и молекулярных факторов, определяющих чувствительность опухолевых клеток к AS1411, в конечном итоге позволит прогнозировать ответ пациентов на терапию. Важной представляется информация о конкретных мутациях или молекулярных дефектах клеток более восприимчивых к действию AS1411.

1.5.3 Проблема плейотропности при создании G4-аптамеров

Из проведенного обзора данных литературы следует, что G4 распознаются и связываются с белками-мишениями противоопухолевой терапии. Связывание приводит к ингибированию функциональной активности данных белков, при этом, в основном константа диссоциации лежит в микро- и наномолярном диапозоне концентраций.

Для анализа плейотропности действия G4-аптамеров необходимо рассмотреть какие на данный момент существуют G4-аптамеры, функции их белков-мишеней, особенности взаимодействия G4-аптамер - белок-мишень, а также влияние G4-аптамеров на жизнедеятельность клетки.

Учитывая, что все рассмотренные примеры взаимодействия G4-белок требуют формирования G4, становиться очевидно, что определяющим критерием в связывании является пространственная G-квадруплексная структура аптамера, а не только его гуанин-богатая последовательность.

Таким образом, к настоящему времени разработаны биоинформатические методы анализа, позволяющие провести выявление наиболее распространенных в геноме человека G4-мотивов, существуют хорошо разработанныеметоды физикохимического анализа, позволяющих изучить конформационные особенночсти формируемых в геноме человека G4 и разработаных G4-аптамеров к мишеням таргетной химиотерапии опухолей. В то же время анализ кросс-парных взаимодействий G4-аптамеров и мишений таргетной химиотерапии опухолей до настоящего времени проведен не был, что представляет как теоретический, так и практический интерес в плане детализации механизма действия G4-аптамеров. При выявлении плейотропности действия G4-аптамеров, то есть исключительно сложного механизма их действия на клетку встает вопрос о целесообразнгости использования таких агенолов в химиотерапии опухоли. Для понимания перспектив использования G4-аптамеров в химиотерапии злокачественных новообразований необходима оценка изберательности их действия в отношении опухолевых клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Список использованных в работе реактивов

- 1. Гидрокортизон, «Stemcell Technologies», Канада
- 2. Деионизованная вода, очищенная с помощью системы Milli-Q (Millipore, США)
- 3. Диметилсульфоксид (ДМСО), «ПанЭко», Россия
- 4. Инсулин человеческий, «ПанЭко», Россия
- 5. Набор реагентов "ОТ-1" для проведения обратной транскрипции, «Синтол», Россия
- 6. Набор реагентов «ПЦР-комплект» для ПЦР в реальном времени, «Синтол», Россия
- 7. Натрий хлорид, «Химмед», Россия
- 8. Натрий-фосфатный буфер (PBS), «Flow Laboratories», Англия
- 9. Пенициллин-стрептомицин, «ПанЭко», Россия
- 10.Раствор A (100 mM KCl; 20 mM HEPES)
- 11.Раствор Версена, «ПанЭко», Россия
- 12.Раствор трипсина-ЭДТА 0,25%, «ПанЭко», Россия
- 13. Pacтвор B (100 mMLiCl; 20 mMHEPES)
- 14.Среда DMEM/F-12 без глутамина, «ПанЭко», Россия
- 15.Среда DMEM без глутамина, «ПанЭко», Россия
- 16.Сыворотка крови лошади, «ПанЭко», Россия
- 17.Эмбриональная телячья сыворотка (fetal bovine serum, FBS), «ПанЭко», Россия
- 18.Эпидермальный фактор роста (EGF), «ПанЭко», Россия
- 19. Этиловый спирт
- 20.BRACO-10 (BRACO19 trihydrochloride), «Sigma-Aldrich», CША
- 21. Набор для выделения PHK, GeneJET RNA Purification Kit #K0732, «Thermo Fisher Scientific», США
- 22. L-глутамин, «ПанЭко», Россия

- 23.МТТ-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромид), «ПанЭко», Россия
- 24. Pyridostatin (Pyridostatin trifluoroacetate salt), «Sigma-Aldrich», CША
- 25.TmPyP4, «Sigma-Aldrich», CША
- 26.β-меркаптоэтанол, «Sigma-Aldrich», США
- 27. Полибрен, «Sigma-Aldrich», США
- Репортерная конструкция Cignal Lenti STAT3 Reporter (luc), «Qiagen», CLS-6028L
- 29. Счетчик 510719 LS 6500 Miniature Vial System, 240V, «Beckman»

2.2 Культивирование клеток

Клетки линии MCF-7 высевали в культуральные флаконы (5мл) в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,32 мг/мл глутамина и 0,5% пенициллина, 0,5% стрептомицина по 5000 клеток на флакон. Клетки линии MCF-10A высевали в культуральные флаконы (5мл) в среде DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) с добавлением 5% сыворотки крови лошади, 20 нг/мл EGF, 10 мкг/мл инсулина, 0,5 мг/мл гидрокортизона, 1% пенициллина и 1% стрептомицина по 7000 клеток на флакон.

Культуральные флаконы с клетками содержали в CO₂-инкубаторе в атмосфере с пониженной долей кислорода (5% CO₂, 3% O₂) при 37°C.

2.3 Определение цитотоксичности с помощью МТТ-теста

Цитотоксический эффект определяли с помощью МТТ-теста. МТТ-тест является общепринятым колориметрическим методом для определения количества жизнеспособных клеток и цитотоксической (антипролиферативной и/или проапоптотической) активности различных химиопрепаратов. Данный метод основан на восстановлении МТТ-реагента (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2-5-дифенил-тетразолий бромид) НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазами в оптически активное вещество синего цвета – формазан. Количество формазана, образовавшегося в результате данной реакции пропорционально количеству жизнеспособных клеток в лунке (Рисунок 12).



Рисунок 12 - Реакция превращения МТТ-реагента в формазан под действием митохондриальных ферментов живых клеток

Измерение цитотоксичности G4-аптамеров проводили на двух клеточных линиях: MCF-7 и MCF-10A. Для реализации анализа клетки обеих линий высаживали в 96-луночные планшеты по 1000 клеток в каждой лунке (объем клеточной среды – 200 мкл). Для снижения краевых эффектов все крайние лунки планшета заполняли водой и не использовали для измерений. Клетки инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C, после чего в среду культивирования добавляли растворы G4-аптамеров в объеме 10 мкл с концентрацией, необходимой для достижения желаемой концентрации G4-аптамера в среде. Затем клетки инкубировали в течение 96 часов при температуре 37°C. В каждую лунку добавляли 10 мкл МТТ-реагента (5 мг/мл МТТ, 0,9 M NaCl), инкубировали в течение 4 часов при температуре 37°C. Культуральную среду удаляли и добавляли 100 мкл ДМСО для растворения формазана, выпавшего в осадок. Измеряли оптическую плотность при 570 нм на

спектрофотометре Multiscan FC, ThermoScientific. Выживаемость клеток при каждой концентрации G4-аптамерова рассчитывалась по формуле:

выживаемость (%) = $\frac{OD - OD_0}{OD_{control} - OD_0} \cdot 100\%$, где

OD – оптическая плотность образца;

 OD_0 – оптическая плотность фонового сигнала;

OD_{control} – оптическая плотность контрольного образца (без добавления G4аптамера).

Измерение каждого образца проводили в трех повторах.

Для каждого G4-аптамера строили зависимость выживаемости клеток от концентрации, из которой определяли значение полумаксимальной концентрации ингибирования (IC₅₀), то есть такой концентрации G4-аптамера, при которой наблюдалось снижение количества клеток на 50% по сравнению с контрольным образцом. Из полученных графиков рассчитывали значения IC₆₀, IC₈₀ и IC₉₀. Эти концентрации использовали в дальнейшем для обработки клеток.

2.4 Выделение плазмидной ДНК

Отдельная колония клеток E.coli, содержащая трансформированные плазмидой клетки, перемещалась с культуральной чашки с LB-агаром и ампициллином (50 мкг/мл) в 10 мл среды LB с ампициллином той же концентрации и выращивалась в течение 10ти часов при +37 °C при интенсивном 66 перемешивании (200 об/мин). Затем плазмидную ДНК выделяли из бактериальных клеток с использованием коммерческого набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (cat. nos. 12162), согласно инструкции производителя. Бактерии осаждали центрифугированием (3000 g, 10 мин, +4 °C). Осадок клеток ресуспендировали в 150 мкл раствора 1 и инкубировали 5 мин на льду. Затем добавляли 400 мкл лизирующего раствора 2, содержимое пробирки аккуратно перемешивали и инкубировали на льду 5 мин до полного лизиса клеток. После этого вносили 250 мкл раствора 3, пробирку немедленно встряхивали 5-6 раз и центрифугировали 15 мин при 10000- 15000g для получения осадка, содержащего

геномную ДНК бактерий, связанных с ней компонентов клеточной стенки и выпавших в осадок белков. Надосадочную жидкость переносили в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропилового спирта. Содержимое пробирок центрифугировали 10 мин при 10000-15000 g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок промывали 70% этиловым спиртом и высушивали. Осадок растворяли в 200 мкл раствора РНКазы А (100-200 мкг/мл) в воде и инкубировали при +37 °C 15-30 мин для деградации бактериальной РНК. После инкубации к раствору добавляли равный объем смеси фенола- хлороформа в соотношении 1:1. Производили интенсивное перемешивание с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 15000 g. Верхнюю водную фазу аккуратно переносили в новую пробирку, и процедуру повторяли. Затем к отобранной водной фазе добавляли равный объем хлороформа, пробирку тщательно встряхивали и проводили пятиминутное центрифугирование при 15000 g. Надосадочную жидкость отбирали и переосаждали плазмидную ДНК 2,5 объемами 96% этилового спирта в присутствии 0,1М NaCl, смесь охлаждали 20 мин при -20 °C и центрифугировали 10 мин. при 10000-15000 g. Осадок промывали 70% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 50 мкл воды. Концентрацию плазмидной ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ® ND-1000 («NanoDrop Technologies Inc.», CША).

2.5 Круговой дихроизм

Круговой дихроизм является одим из эффектов оптической анизотропии, и проявляется в различии коэффициентов поглощения света, поляризованного по правому и левому кругу. Правовращающий и левовращающий поляризованный свет представляют два возможных угловых спиновых момента состояний фотона [208]. Спектры КД измеряли на CD-спектрометре «CHIRASCAN» («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) и модифицированном дихрографе «MARK-5» («Jobin-Yvon», Франция). Регистрацию проводили в интервале длин волн от 220 до 350 нм (в кювете с длиной оптического пути 1 см) при температуре 37°С. Скорость изменения длины волны составляла 1 нм/сек. Для каждого олигонуклеотида спектр КД регистрировали

в двух разных буферных растворах: Буфер A (100 mM KCl; 20 mM HEPES) и Буфер B (100 mM LiCl; 20 mM HEPES).

Обработку изображений и математических данных проводили с помощью программ «Origin 8.0».

2.6 Трансформация компетентных клеток Е. Coli

К 100 мкл компетентных клеток на льду добавляли раствор, содержащий лигазную смесь и вектор p19 (10 мкл), и инкубировали 30 мин на льду. После этого клетки подвергали тепловому шоку (+42 °C, 90 сек) и снова инкубировали на льду 5 мин. Затем к клеткам добавляли 1 мл среды LB без ампициллина и проводили инкубацию при +37 °C в течение 60 мин. Суспензию клеток центрифугировали при 3000 g 10 мин. Осадок клеток в остаточном объеме 100 мкл высевали на чашки Петри с LB-агаром и 50 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали в течение 16-24 часов при +37 °C. Плазмидную ДНК клонов анализировали с помощью рестрицирующих эндонуклеаз, ПЦР in situ, а также секвенированием.

2.7 Инфицирование псевдовирусными частицами

Влияние аптамеров G4 на транскрипционную активность STAT3 было протестировано на клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с геном люциферазы светлячка под контролем STAT3-респонсивных элементов, введенных в геном. Для этого клетки MCF-7 инфицировали репортером Cignal Lenti STAT3 Reporter (luc) в соответствии с протоколом производителя («Qiagen», CLS-6028L). Репортерный элемент содержал также ген устойчивости к генетицину. Таким образом проводя селекцию клеток в клеточной среде, содержащей генетицин, были отобраны клетки, несущие целевую генетическую конструкцию.

Инфицирование проводили в формате 96-луночных планшетов. За день до инфекции клетки-мишени (клеточные линии человека) высевали в 200 мкл среды. К моменту инфицирования конфлюэнтность клеток составляла 20- 30%. В день инфицирования среду заменяли: удаляли среду из лунок. В каждую лунку добавляли 20 мкл лентивирусных частиц Cignal и доводили общий объем до 50 мкл, используя среду для выращивания без антибиотиков (DMEM с 10% FBS, 0,1 мМ NEAA, 1 мМ пируват натрия) и добавляли в каждую лунку полибрен (Sigma) до конечной концентрации 8 мкг/мл для повышения эффективности заражения ретровирусами эукариотических клеток в клеточной культуре. После окончания инфицирования клетки наращивали 48 часов, после чего пересеивались на 60-мм культуральные чашки для селекции клонов клеток устойчивых к антибиотику генетицину. Для контроля селекции рассевали неинфицированные клетки. В случае ретровирусной инфекции селекция проводилась на генетицин (Geneticin, Sigma) в течение 8-9 дней, среду с антибиотиком меняли каждые 2-3 дня. После окончания селекции клетки наращивали до состояния субконфлюэнтности, замораживали при -70°C в эмбриональной сыворотке с 10% ДМСО.

2.8 Изучение влияния G4-аптамеров на биосинтез ДНК

Метод обнаружения репликационной активности, основан на включении модифицированных нуклеозидов в реплицированную ДНК и их последующем обнаружении методом авторадиографии. Клетки МСF-7 в 96-луночных планшетах инкубировали с олигонуклеотидами 24 часа, добавляли 1 мкКи ³Н-тимидина и инкубировали 4 часа. Затем клетки лизировали дистиллированной водой, переносили на целлюлозную мембрану, просушивали и переносили во флаконы, содержащие сцинтилляционную жидкость для обнаружения радиоактивности образца. Измеряли количество импульсов в минуту на счетчике фирмы Beckman (510719 LS 6500 Miniature Vial System, 240V).

2.9 Оценка уровня ингибирования топоизомеразы І

Для определения способности олигонуклеотидов ингибировать активность TOP1 *in vitro* выделенный ядерный экстракт клеток HeLa инкубировали с 0,2 мкг сверхспирализованной плазмидной ДНК pUC19 с добавлением различных количеств олигонуклеотидов в коммерческом буферном растворе в течение 30 минут при 37°С. Реакцию останавливали внесением SDS до конечной концентрации 1%, обрабатывали протеиназой К с конечной концентрацией 50 мкг/мл в течение 60 минут при 55°С. Продукты реакции разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле с TAE-буфером. Для нанесения плазмидной ДНК в лунку в агарозном геле использовался буферный раствор высокой плотности (30% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий). Электрофорез проводили при максимальном напряжении электрического поля 2 В/см. Полученный гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Визуализацию ДНК в геле регистрировали по флуоресценции в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм. Полученные изображения обрабатывали с помощью программ ImageJ и Origin 8.0.

Для каждой концентрации исследуемых олигонуклеотидов расчитывали значение степени ингибирования. Для этого использовали следующую формулу:

степень ингибирования (%) =
$$\frac{S-S_0}{S_{control}-S_0} \cdot 100\%$$
, где

S – содержание суперскрученной плазмиды в образце;

S_{control} – содержание суперскрученной плазмиды в контрольном образце, не содержащем олигонуклеотида;

*S*₀ – содержание суперскрученной плазмиды в контрольном образце, не содержащем TOP1.

После этого строили зависимость степени ингибирования от концентрации олигонуклеотида, и по полученному графику определи концентрацию полумаксимального ингибирования TOP1 (IC₅₀). Каждое измерение проводилось в трех повторах.

2.10 Изучение влияния G4-аптамеров на активность транскрипционного фактора STAT3

Клетки трансфицировали согласно выше описанному протоколу в 24луночных плашках, затем клетки промывали физиологическим раствором (10 мМ Tris-HCl pH7,5; 0,14 M NaCl) и добавляли в лунки лизирующий буфер (50 мМ Tris-HCl (pH=7,5), 1 мМ EDTA, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 1 мМ DTT, 1мМ PMSF, 0,1 мМ Na-ортованадат и 1%-ный апротинин), оставляли на 30 минут при +4°C. В полученных таким образом экстрактах определяли активность β- галактозидазы и люциферазы.

Активность люциферазы определяли на люминометре Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария) по стандартному протоколу с помощью соответствующего готового набора Luciferase Assay System (Promega, США)

Расчет активности STAT3 проводили по формуле

активность Stat3 (%) = $\frac{I-I_0}{Icontrol-I_0} \cdot 100\%$, где

I – интенсивность биолюминисценции образца;

*I*₀ – интенсивность биолюминисценции фонового сигнала;

I_{control} – интенсивность биолюминисценции контрольного образца (без олигонуклеотидов).

2.11 Статистическая обработка результатов

Результаты представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Различия считались статистически значимыми при p<0,05. Полученные данные рассчитывали как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD) или ошибкой среднего (SEM). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмагорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica10 (StatSoft, США). Были использованы t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони, различия считались статистически значимыми при p<0,05.

ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Обоснование общей стратегии проведения исследования

Современная стратегия разработки G4-аптамеров заключается в поиске последовательности ДНК, формирующей стабильный G4, который образует комплекс с целевым G4-распознающим белком. Вследствие этого связывания целевой G4-белок приводит к положительным терапевтическим ингибируется, что эффектам. Фундаментальные аспекты функционирования G4, которые необходимы для детального понимания механизмов действия экзогенных G4-аптамеров, изучены недостаточно. Однако накопленные данные о распространении G4 в геноме (от 375 до 550 тыс. последовательностей), об их неравномерной локализации по геному, а также выявление большого количества G4 распознающих белков дают основание полагать, что данная альтернативная структура нуклеиновых кислот играет важную роль в сложной системе регуляции многих процессов жизнедеятельности клетки. Для лействия G4-аптамеров понимания механизмов экзогенных аспекты функционирования эндогенный G4-мотивов имеют исключительно важное значение. В частности, такими аспектами являются: распределение G4-мотивов в промоторных областях генов и определение последовательности наиболее часто встречающихся из них, физико-химические особенности формирования G4 наиболее часто встречаемым в промоторной области генов G4-мотивами и физико-химические особенности формирования G4 структуры G4-аптамерами, возможности перекрестного взаимодействия различных G4 И G4-распознающих белков И, наконец, избирательность действия G4-аптамеров на опухолевые клетки. Представленное исследование посвящено анализу этих фундаментальных основ применения G4аптамеров в противоопухолевой терапии.

До настоящего времени в научной литературе не представлены данные по анализу селективности действия G4-аптамеров. Отсутствует системное исследование влияния G4-аптамеров, определенных как специфичные ингибиторы целевых белковонкогенов, на другие G4-распознающие внутриклеточные белки, не являющиеся исходными мишенями. Анализ подобных кросс-взаимодействий необходим для лучшего понимания механизма действия G4-аптамеров, предсказания возможных побочных эффектов и формирования наилучших стратегий отбора G4-аптамеров для разработки противоопухолевых препаратов.

Чтобы восполнить этот пробел в системе знаний, для анализа плейотропности G4, из работ, представленных в современной научной литературе, были отобраны последовательности G4-аптамеров, которые были разработаны как потенциальные противоопухолевые агенты. Также в исследование включили гуанин-богатые олигонуклеотиды с регулярными последовательностями, которые, исходя из закономерностей формирования G4, должны также представлять собой G4-аптамеры.

Возможность формирования G4 выбранными гуанин-богатыми олигонуклеотидами была подтверждена методом спектроскопии кругового дихроизма при проведении анализа в буферном растворе, по ионному составу соответствующему внутриклеточной среде. По характеру спектров кругового дихроизма была определена конформация формируемых G4.

Эффекты G4-аптамеров были изучены на двух линиях клеток: клеточной линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и клеточной линии нормального эпителия молочной железы MCF-10A. Для каждого G4-аптамера было определено его влияние на жизнеспособность данных клеточных линий. Цитотоксический эффект был сопоставлен с влиянием G4-олигонуклеотидов на процесс репликации (активность синтеза ДНК *de novo*).

Далее была оценена способность выбранных G4-олигонуклеотидов подавлять функционирование TOP1 - одного из ключевых ферментов в регуляции топологического состояния ДНК, и в том числе при репликации. Также было определено влияние G4-олигонуклеотидов на активность транскрипционного фактора STAT3. Далее было проведено сопоставление полученных закономерностей с целью подтверждения/опровержения существования плейотропного эффекта G4-аптамеров.

3.2 Биоинформатический поиск G-богатых мотивов в геноме

Формирование G4 внутриклеточными ДНК и РНК в настоящее время принято рассматривать как механизм регуляции различных клеточных процессов, и накоплен большой объем доказательств широкого распространения данных последовательностей в геноме. Большая распространенность G4-мотивов в геноме человека позволяет предположить, что в промоторных областях разных генов наряду с уникальными последовательностями, таким как G4-мотив в области NHE III промотора онкогена C-MYC, могут существовать G4-мотивы с одинаковыми нуклеотидными последовательностями. Такие повторяющиеся G4-мотивы могут взаимодействовать с одними и теми же G4-распознающими белками и служить участниками координированного изменения экспрессии групп генов.

В представленном исследовании выбор метода для определения наиболее распространенных G4-мотивов в промоторах генов осуществлен на основе анализа существующих методов биоинформатического анализа генома человека.

3.2.1 Анализ существующих подходов биоинформатического скрининга G4-мотивов в геноме человека

В настоящее для поиска G4-мотивов применяется методы, соответствующие трем основным подходам:

1)Методы поиска заданной последовательности, определенной конкретным алгоритмом с помощью ряда программ: ImGQfinder, Quadparser, Quadfinder, QuadBase2, G4-iM Grinder, TetraplexFinder, PQSfinder, QGRS Mapper;

2)Методы скользящего окна, позволяющий выявлять G4-мотивы, включающие в определенном порядке в свой состав как гуанины, потенциально образующие квартеты, так и петли переменного размера и состава G4P Calculator, G4RNA Screener, cG/cC, G4Hunter);

3)Методы использования алгоритмов с применением нейросетей и машинного обучения (Quadron, G4RNA Screener)

Большинство опубликованных вариантов использования современных методов анализа поиска G4-мотивов приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Инструменты поиска G4-мотивов в геномах. Инструменты перечислены в хронологическом порядке их публикации

Использованный	Название	Описание алгоритма	ссылка
подход	и год		
	публикаци		
	И		
Метод поиска	Quadparser	G3+N1-7G3+N1-7G3+N1-7G3+	[209]
заданной	2005		
последовательности			
Метод поиска	Quadruplex	G3-5N1-7G3-5N1-7G3-5N1-7G3-5	[210]
заданной	es		
последовательности	2005		
Метод скользящего	G4P	количество G-трактов на окно ≥3; ≥4;	[39]
окна	Calculator	длина окна 100 нт;	
	2006	длина скользящего интервала 20 нт.	
Метод поиска	Quadfinder	GxNy1GxNy2GxNy3Gx,	[211]
заданной	2006	х обозначает количество G в G-тракте,	
последовательности		y1, y2 и y3 обозначают длины петель	
Метод поиска	QGRS	Правила фолдинга	[212]
заданной	Mapper	$Gx \ge 2Ny1G x \ge 2Ny2G x \ge 2Ny3G x \ge 2$	
последовательности	2006	Длина G-тракта одинаковая для G-	
		трактов в одном G4-мотиве-2 и более	
		Длина G4-мотива – не более 45	
		нуклеотидов	
Метод поиска	AllQuads	G3+N1-7G3+N1-7C3+N1-7C3+	[213]
заданной	2016	G3+N1-7C3+N1-7G3+N1-7C3+	
последовательности		G3+N1-7C3+N1-7C3+N1-7G3+	
		G3+N1-7G3+N1-7G3+N1-7C3+	
		G3+N1-7G3+N1-7C3+N1-7G3+	
Метод поиска	QuadBase2,	Гибкие правила фолдинга позволяющие	[214]
заданной	2016	пользователю задать	
последовательности		- длину G-тракта	
		- длину петли	
	~		50455
Метод скользящего	G4Hunter	G-тракты в окне оцениваются от 1 до 4 по	[215]
окна	2016	числу гуанинов в их составе (если число	
		гуанинов >4, скор равен 4)	
		длина скользящего интервала 25 нт.	

Использованный	Название	Описание алгоритма	ссыл
подход	и год	Ĩ	ка
	публикации		
Метод машинного	Quadron	метод машинного обучения на основе	[216]
обучения	2017	градиентного бустинга на модели дерева	
		решений	
Метод поиска	PQSfinder,	Гибкие правила фолдинга, позволяющие	[217]
заданной	2017	пользователю задать	
последовательности		-длину G-тракта,	
		-количество выпетливаний	
		-несоответствий в G-тракте,	
		-длину петли	
		алгоритм выполняется в три шага:	
		шаг 1: определение всех возможных G-	
		трактов;	
		шаг 2: присвоение баллов;	
		шаг 3: разрешение наложении	[210]
Метод поиска	ImGQfinder	$G_{1-1NG_{n-1}+1}(LX_{j}G_{n})3, j=1,2,3$	[218]
заданнои	2017	GnLXIGI-INGn-1+I(LXJGn)2, J=2,3	
последовательности		(GnLXI)2GI-INGn-I+ILX3Gn, J=1,2	
		(GnLAJ)SGI-INGI-I+1, J=1,2,5	
		GI-INGN-I(LXJGN)3, J=1,2,3	
		(CnI X1)2Ci 1NCn iI X2Cn i-12	
		(GnLXI)2Gi-INGn-iLX3Gii, j=1,2	
		N – побой несоответствующий или выпуклый	
		нуклеотил	
		Хі - число нуклеотилов в петле:	
		x_{1} - число пуклеотидов в петле,	
		n - число тетрал (n>3)	
		і - позиция лефекта в серии G ($1 \le i \le n$ лля	
		выпуклостей;	
		1 <i <n="" i="1" n="" td="" для="" для<="" и="" или="" несоответствий=""><td></td></i>	
		вакансий).	
Метод машинного	G4RNA	Искусственная нейронная сеть (ANN),	[219]
обучения	Screener	обученная на последовательностях,	
	2017	формирование которыми РНК-G4	
		подтверждено экспериментально	
Метод поиска	G4PromFinder	GxNyGxNyGxNyGx,	[220]
заданной	2018	$4 \ge x \ge 2,$	
последовательности		$10 \ge y \ge 1$	
		Максимальная длина 30 нт	
Метод поиска	G4-iM Grinder	Гибкие правила фолдинга, позволяющие	
заданной	2020	пользователю варьировать 13 параметров	
последовательности		поиска	
		https://doi.org/10.1093/nargab/lqz005	

В работе J.Huppert & S.Balasubramanian [209] впервые была определена каноническая последовательность, способная формировать G4, как соответствующая формуле G_{n≥3}N₁₋₇G_{n≥3}N₁₋₇G_{n≥3}N₁₋₇G_{n≥3}, которая послужила основой для дальнейшего развития алгоритмов поиска G4-последовательностей в геноме.

После расширения понятия G4-структур, а также появлении данных о влиянии длины петель, окружения и ряда других факторов на термодинамическую устойчивость G4, стали доступны биоинформатические инструменты нового поколения. Более поздние модели позволили увеличивать допустимую длину петель в составе G4, учитывать выпетливания в G-тракте или замену гуанина в G-тракте на другой нуклеотид. Так, например модель ImGQfinder учитывает не только каноническую последовательность, способную формировать G4, а также нарушения G-трактов в составе G4-мотива (вставка нескольких нуклеотидов между гуанинами в G-тракте). Доказано, что такие отступления от канонической G4-последовательности не препятствуют формированию гуанин-богатыми мотивами стабильных G4 [218].

Разработанный в 2016 году алгоритм AllQuads позволил находить в геноме последовательности, способные формировать межмолекулярные G4 (с участием прямой и обратной цепей ДНК). Использование этого алгоритма позволило выявить свыше 550 000 последовательностей, потенциально способных формировать G4 структуры.

С использованием G4-iM Grinder алгоритма оказалось возможным выявлять в геноме не только потенциальные G4-мотивы, но и i-мотивы, а также G4-структуры более высокого порядка. Данный инструмент позволяет пользователю варьировать 13 параметров поиска и самостоятельно задавать критерии последовательностей, которые можно рассматривать в качестве потенциальных G4-мотивов.

В рамках данной части исследования не ставилась задача разработки более совершенного алгоритма поиска G4-мотивов в геноме по сравнению с существующими. Решаемая задача состояла в анализе распространенности одинаковых G4-мотивов в промоторах генома человека. На основании проведенного

анализа для решения данной задачи был выбран подход скользящего окна, как вполне адекватный и наиболее простой метод биоинформатического анализа.

3.2.2 Выявление распространенных G4-мотивов в промоторных областях генов

Для определения наиболее распространенных G4-мотивов в промоторах генов был проведен биоинформатический анализ генома человека в сотрудничестве с к.фм.н. Алексеевским А.В., (отдел математических методов в биологии НИИ Белозерского). Биоинформатический анализ проводили с использованием референсной геномной последовательности человека Human genome GRCh37/hg19. Для выявления G4-мотивов в геноме применяли подход скользящего окна, длина окна была выбрана протяженностью 30 нуклеотидов. В качестве G4-мотива принимали последовательность, содержащую более четырех трактов, состоящих ИЗ расположенных подряд не менее трех гуанинов (G>3). Так же учитывались последовательности, содержащие нарушения G-трактов – допускалось наличие «прерванного тракта», то есть включения иных нуклеотидов в GGG-тракт, а также замена одного гуанина в G-тракте на другой нуклеотид.

На первом этапе исследования были выявлены гены, содержащие G4-мотивы на расстоянии не более 500 пар нуклеотидов от сайта старта трансляции. Далее был проведен анализ наиболее распространенных G4-мотивов по числу гуанинов в тракте и нуклеотидов между ними. При анализе учитывали расположение G4-мотивов на кодирующей и некодирующей нитях ДНК.

Было установлено, что G4-мотивы в 1,4 раза чаще встречаются на некодирующей нити, и после транскрипции уже в составе м-РНК G4-мотивы участвуют в регуляции трансляции.

Поскольку топология G4 в большей степени определяется размером «петель» и в меньшей степени зависит от их нуклеотидного состава, найденные G4-мотивы были проанализированы с точки зрения количества гуанинов в составе G-трактов и длины каждой из трех петель. Алгоритм поиска соответствовал следующей формуле: N(G)N(A,T,C)N(G)N(A,T,C)N(G)N(A,T,C)N(G).

Список выявленных G4-мотивов представлен в таблице 4.

Таблица 4 - Распределение наиболее распространенных повторов на кодирующей и некодирующей цепях ДНК

Матричная нить ДНК		Кодирующая нить ДНК		
Цифровое	Количество генов,	Цифровое	Количество генов,	
обозначение	содержащих этот	обозначение	содержащих этот	
повтора	мотив в промоторе	повтора	мотив в промоторе	
3131313	46	3131313	70	
3232323	41	3135313	69	
3141414	34	3141414	67	
3333333	29	3434343	50	
3434343	29	3232323	44	
4141414	29	3333333	44	
3135313	26	4141414	37	
4343434	24	4242424	31	
3531313	21	3141413	30	
3135353	20	3531313	28	
3141413	19	3145314	26	
3531353	19	3135353	24	

По данным проведенного анализа, существует более 10 G4-мотивов, которые встречаются в промоторах более чем 20-ти различных онкогенов. Наиболее распространенным G4-мотивом оказалась последовательность GGGN1GGGN2GGGN3GGG, где N1, N2, и N3 могут быть представлены любым из трех нуклеотидов: А, Т или С.

3.2.3 Термодинамическая стабильность и особенности вторичной структуры G4-мотива, наиболее распространенного в геноме человека

Для анализа структуры, формируемой наиболее распространенным G4-мотивом -(G₃N₁)₄-, была проанализирована конформация олигонуклеотида –

GGGTGGGTGGGTGGGT-. Следует отметить, что выбор данного варианта последовательности -(G₃N₁)₄- был обусловлен тем, что она соответствует G4аптамеру, предложенному для специфического ингибирования белка STAT3 [153].

Термодинамические параметры вторичной структуры олигонуклеотида были определены при помощи УФ-спекторскопии. О формировании G4 структуры свидетельствует определенный характер температурной зависимости УФ-поглощения образца при 295-297 нм. В отличие от ДНК-дуплекса, плавление которого наблюдается при длине волны 260 нм и сопровождается гиперхромным эффектом, при разрушении G4 происходит уменьшение оптической плотности раствора. Длина волны, при которой гипохромный эффект максимален, соответствует 295-297 нм [221] (Рисунок 13).



Рисунок 13 - Кривая УФ-плавления олигонуклеотида ТВА

Вероятно, это связано с особенностями УФ-поглощения гуанина (существование «плеча») в длинноволновой области) и необычной геометрией стэкинг-взаимодействий между G-тетрадами.

Если олигонуклеотид не структурирован, то при его нагревании оптическая плотность при 295 нм, как и при 260 нм незначительно растет за счет ослабления стэкинг-взаимодействий оснований; причем этот процесс является некооперативным (Рисунок 14).



Рисунок 14 - Кривая плавления олигонуклеотида случайной последовательности при длине волны 295 нм

В то же время, разрушение G4 структуры, как и ДНК-дуплекса, сопровождаемое разрывом водородных связей, происходит кооперативно, что отражается в S-образной форме кривой УФ-плавления. Следует отметить, что метод УФ-спектроскопии позволяет независимо следить за денатурацией G4 и дуплексного доменов при 295 нм и 260 нм соответственно, в олигонуклеотидах, содержащих оба структурных мотива в своем составе.

Характер кривых УФ-плавления (GGGT)₄ в буфере A (20 mM HEPES-KOH, 140 mM NaCl, 50 mM KCl, pH=7,3) свидетельствуют об образовании G4 (Рисунок 15). Гипохромный эффект (h) сопровождающий разрушение структуры (GGGT)₄, превышает 10%, при этом стабильность структуры настолько высока (T_{пл} > 85°C), что довести ее денатурацию до конца в условиях проведения эксперимента не удается. Однако полученные данные однозначно свидетельствуют о возможности формирования G4 как эндогенным G4-мотивом, так и G4-аптамером.



Рисунок 15 - Кривая плавления олигонуклеотида (GGGT)₄ в буфере А при длине волны 295 нм

Метод УФ-спектроскопии позволяет установить факт формирования вторичной структуры (G4 или дуплекс) и ее термодинамическую устойчивость, однако он не позволяет различать между собой тип структуры G4 (параллельный или антипараллельный). Для определения типа G4 был применен метод КД-спектроскопии.

Нуклеиновые кислоты являются оптически активными веществами, пространственная организация которых влияет на спектр кругового дихроизма. Метод КД-спектроскопии основан на различной способности хиральных веществ поглощать левополяризованный и правополяризованный свет.

Метод КД дает возможность легко различать формы двуспиральных нуклеиновых кислот, например В-, А-, Z-форму, имеющих разные геометрические параметры и, как следствие, разную асимметрию вторичной структуры. В связи с этим круговой дихроизм широко применяется для дискриминации топологии G4.

Спектр антипараллельной структуры имеет характерный положительный пик с максимумом при длине волны 295 нм, отрицательный пик при 267 нм и положительную полосу с максимумом около 240 нм. Спектр параллельного G4 резко отличается от спектра антипараллельной структуры (Рисунок 16), - отсутствует

характеристическая длинноволновая полоса, а максимум положительного пика расположен в зоне 240 нм.



Рисунок 16 - Различие спектров КД (в единицах молярной эллиптичности) параллельного (синяя линия) и антипараллельного (красная линия) G4

Регистрация изменения сигнала КД при выбранной длине волны в зависимости от температуры дает возможность построить кривую плавления образца.

Топология G4, сформированного последовательностью (GGGT)₄, была проанализирована методом КД. Спектры КД (Рисунок 17) свидетельствуют о параллельном расположении цепей в структуре G4. Серия спектров, снятых при разных температурах позволяет получать кривые плавления из данных кругового дихроизма (Рисунок 17).



Рисунок 17 - КД-спектр (GGGT)4 в буфере А

3.3 Исследование G4-аптамеров, предлагаемых в качестве противоопухолевых агентов

В последующих подразделах был проведен анализ характеристик гуанинбогатых олигонуклеотидов, которые представляют собой опубликованные аптамеры, разработанные в качестве нгибиторов к белкам-мишеням противоопухолевой терапии, а также ряда их аналогов, модификация последовательности которых с теоретической точки зрения должна была обеспечить большую стабильность G4 или облегчить их фолдинг.

3.3.1 Выбор последовательностей G4-аптамеров и G4-олигонуклеотидов

Нами был проведен поиск среди опубликованных научных данных последовательностей G4-аптамеров, разработанных к таргетным белкам противоопухолевой терапии. В исследование были включены те G4-аптамеры, белкимишени которых рассматриваются как потенциальные мишени таргетной терпии, то есть как минимум один ингибитор их активности в настоящее время проходит предклинические исследования или клинические испытания.

Так при анализе опубликованных данных по разработке G4-аптамеров для противоопухолевой терапии были отобраны G4-аптамеры к следующим таргетным белкам противоопухолевой терапии.

•Нуклеолин

•TOP1

•STAT3

•SP1

•VEGF

•SHP2.

Последовательности данных аптамеров, белок-мишень, IC50, константа связывания с целевым белком, а также ссылка на соответствующие исследования указаны в таблице 5. Отобранные для изучения аптамеры были названы по следующей

схеме: G4-название целевого белка. Названия олигонуклеотидов AS1411 и Macugen оставили без изменений, так как они были использованы в целом ряде публикаций различных исследовательских групп по изучению данных аптамеров.

Олигонуклеотид, обозначенный в данной работе как Macugen является ДНКаналогом аптамера к VEGF [222]. Данный олигонулеотид был использован в качестве отрицательного контроля как последовательность, обладающая биологической активностью (подавление активности VEGF), но не способная формировать G4 (Таблица 5).

Белок- мишень	Название	Последовательность	IC50, нМ	КК _d , нМ	Ссылка
TOP1	G4-TOP1	GACTACGGGTTGGTGGTGGGTAGT CTT	280	-	[127]
SP-1	G4-SP1	GGCGAGGAGGGGGCGTGGCCGG	-	1,3	[73]
VEGF	G4-VEGF	TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTAGA	-	1,1	[174]
VEGF	Macugen	CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCC G	2,5	4,9	[223]
STAT3	G4-STAT3	GGGTGGGTGGGTGGGT	10000	-	[224]
Нуклеолин	G4-NCL	CCCCCCGGGGGCGGGGCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	_	79	[40]
Нуклеолин	As1411	GGTGGTGGTGGTTGTTGTGGTGGTGG	-	25	[225]
SHP2	G4-SHP2	GCGTCGAATACCACTACAGGGGGGTTTT GGTGGGGGGGGGG	29	11	[136]

Таблица 5 - Исходные G4-аптамеры, использованные в настоящей работе

Кроме того, на основе результатов биоинформатического анализа и опубликованных данных по характерирстикам G4, формируемых различными G4мотивами в исследование включили ряд сконструированных G4-аптамеров. Так, в работе были использованы симметричные G4-образующие олигонуклеотиды. Они были включены в исследование, чтобы продемонстрировать, что G4-мотивы, распространенные в геноме, способны формировать G4 и связываться с G4связывающими белками и влиять на их активность. Также в исследование была тракте последовательности аптамера As1411 количество гуанинов было увеличено с двух до трех единиц (Таблица 6). Олигонуклеотид случайной последовательности был использован в качестве контроля (Таблица 6).

Таким образом в исследование были включены 12 олигонуклеотидов (Таблица 5 и таблица 6).

Название	Последовательность
G4-TGT	GGGTGGGTGTGGGG
G4-CCC	GGGTGGGCCCGGGTGGG
As-GGG	GGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGG
Random	CGATGCGTAGCTGAAGCTGCTGCAG

Таблица 6 – Дополнительные G4-олигонуклеотиды использованные в работе

3.3.2 Конформационный анализ изучаемых G4-аптамеров методом кругового дихроизма

Задачей следующего этапа исследования был анализ физико-химических характеристик G4-аптамеров, изучаемых зарубежными научными группами в качестве противоопухолевых потенциальных препаратов. Подтверждение формирования G4-структур исследуемыми олигонуклеотидами, а также определение топологии данных структур проводили методом анализа спектров кругового дихроизма в двух разных буферных растворах. Буферный раствор А был подобран таким образом, чтобы концентрации одновалентных металлов (К⁺ и Na⁺), ионная сила значение рН соответствовали средним значениям внутриклеточной среды эукариотических клеток (кривые обозначены на графиках непрерывной линией) [226]. В буферном растворе A-L i^+ ионы K $^+$ и N a^+ были заменены ионами L i^+ . Таким образом, растворе A-Li⁺ отсутствовали компоненты, способствующие буферном В формированию G4 (пунктирные кривые на графиках).

Графики спектров кругового дихроизма, полученные для олигонуклеотида рендомной последовательности, а также олигонуклеотида Macugen, свидетельствуют о том, что данные два олигонуклеотида не формируют G4 как в присутствии ионов Li⁺, так и в присутствии ионов K⁺ (Рисунок 18, А). Графики спектров данных олигонуклеотидов имеют два экстремума - отрицательный пик при 250 нм и положительный пик при 270 нм, что соответствует графикам спектра неструктурированной ДНК.



Рисунок 18 – Графики спектров кругового дихроизма исследуемых олигонуклеотидов в буферном растворе A (K+) и A-Li+, 37°C: (A) Random; (B) G4-NCL и G4-VEGF; (C) G4-STAT3, G4-SHP2, AS1411; (D) G4-TOP1, G4-SP1

Каждый из графиков спектра КД, полученных для олигонуклеотидов G4-STAT3, G4-SHP2 и AS1411 обладает двумя экстремумами – локальным минимумом при 240 нм и локалным максимумом при 260 нм (Рисунок 18, В). Данные графики соответствуют характерному графику спектра КД параллельного G4. AS1411 в отличие от G4-STAT3 и G4-SHP2 не способен формировать устойчивый G4 в отсутствие ионов K⁺, так как график его спектра в буферном растворе A-Li⁺ не обладает характерным для G4 локальным минимумом при 240 нм, данный пик смещен в более длинноволновую область.

На рисунке 18 (С) изображены графики спектров кругового дихроизма для аптамера к нуклеолину (G4-NCL) и VEGF-A (G4-VEGF). В буфере А графики КД спектров данных аптамеров имеют два положительных пика в области 260 и 290 нм, что свидетельствует о наличии в растворе равновесия двух форм G4: как параллельной, так и антипараллельной. Олигонуклеотид G4-NCL сохраняет способность складываться в структуры G4 и без присутствия ионов калия и натрия, об этом свидетельствует совпадение графиков спектров КД в буфере A-K⁺ и A-Li⁺.

Олигонуклеотиды G4-TOP1 и G4-SP1 формируют антипараллельные G4. Графики спектров КД для этих олигонуклеотидов в буфере A-K⁺ представляют собой типичный вид графиков спектров антипараллельных G4: присутствуют два положительных пика при 245 нм и 290 нм, а также отрицательный пик при 265 нм (Рисунок 18, C). Спектры, полученные для данных олигонуклеотидов в буфере A-Li⁺ указывают на то, что в отсутствии ионов калия и натрия данные олигонуклеотиды не способны формировать G4 (Рисунок 18, D).

График спектра КД олигонуклеотида AsGGG обладает локальным минимумом при 240 нм и локальным максимумом при 260 нм, что соответствует графику спектра параллельного G4 (Рисунок 19). Пик при 260 нм графика спектра AsGGG обладает в 4 раза большей интенсивностью по сравнению с графиком спектра AS1411. При увеличении количества G-трактов, интенсивность положительного пика при 260 нм возрастает, что свидетельствует об увеличении вклада стекинг-взаимодействия в

71

поляризацию проходящего света.





Для олигонуклеотидов G4-TGT и G4-CCC были получены графики спектров КД, подтверждающие их способность образовывать структуры G4 (Рисунок 20). Олигонуклеотид G4-CCC, способен формировать G4 отсутствии не В стабилизирующих ионов (в буфере A-Li⁺), так как интенсивность положительного пика при 260 нм значительно снижается. В буферном растворе A-Li⁺ для олигонуклеотида G4-TGT наблюдается конформационное равновесие между параллельной и антипараллельной формой, на что указывает уменьшение пика при 260 нм и появление положительного пика при 290 нм, хотя параллельная форма G4 по-прежнему преобладает.


Рисунок 20 - Спектры кругового дихроизма исследуемых олигонуклеотидов в буферном растворе A (K+) и A-Li+, 37°C: G4-TGT и G4-CCC

Таким образом было подтверждено формирование G4 структур всеми аптамерами, исследуемыми в данной работе. Среди изучаемых G4-аптамеров присутствуют аптамеры, формирующие параллельные G4, антипараллельные и G4 смешанного типа.

3.3.3 Биологические эффекты G4-аптамеров, предложенных в качестве ингибиторов таргетных белков противоопухолевой терапии

3.3.3.1 Влияние G4-аптамеров на транскрипционную активность STAT3

Как было упомянуто, G4-мотивы распознаются многими транскрипционными факторами, контролируя процесс транскрипции. Наиболее изучено взаимодействие G4 с транскрипционным фактором STAT3, для него также отобран G4-аптамер, который включен в представленное исследование. Поэтому интересным представлялось сравнить между собой влияние G4-аптамеров, разработанных в качестве специфических ингибиторов к различным белками-мишеням таргетной терапии, а также разработанных G4-аптамеров на активность данного транскрипционного фактора.

G4-аптамеры были протестированы на способность ингибировать активность STAT3 в клеточной линии аденокарциномы молочной железы MCF-7. Для этого в геном клетки MCF-7 была введена репортерная конструкция, несущая ген люциферазы светлячка Photinus pyralis под контролем STAT3-ренспонсивных элементов. Таким образом интесивность синтеза люциферазы соот транскрипционной активности STAT3. Так как транскрипционная активность STAT3 запускается под воздействием определенных сигналов, его активацию инициировали добавлением в клеточную среду экзогенного человеческого интерлекина-6 (25 нг/мл).

G-богатые олигонуклеотиды добавляли к клеткам в трех концентрациях (10, 50 и 150 мкМ) и инкубировали на протяжении суток аналогично работам [150, 153]. Далее по интенсивности сигнала люминесценции определяли количество люциферазы светляка, которая напрямую зависит от транскрипционной активности STAT3.

Ингибирующие концентрации исследованных G4-аптамеров в отношении транскрипционной активности STAT3 представлены в таблице 7.

В набор исследуемых олигонуклеотидов был включен аптамер, отобранный к STAT3 – G4-STAT3. Он оказывал наибольший ингибирующий эффект на STAT3. Примечательно, что G4-олигонуклеотид G4-TGT, отличающийся от G4- STAT3 только составом средней петли, является более чем в 5 раз более слабым ингибитором STAT3. Не все олигонуклеотиды из исследуемого набора способны ингибировать данный транскрипционный фактор. Так олигонуклеотиды G4-SHP2, G4-VEGF, G4-NCL, G4-TOP1 и Random не оказывают какого-либо влияния на активность STAT3 в данной модельной системе.

G4-аптамер	IC50, μM
G4-STAT3	15 ± 3
AsGGG	22 ± 5
As1411	47 ± 10
G4-TGT	85 ± 14
G4-CCC	130 ± 20
G4-SP1	140 ± 30
G4-SHP2	no inhibition
G4-VEGF	no inhibition
G4-TOP1	no inhibition
Random	no inhibition
G4-NCL	no inhibition

Таблица 7 - Значения IC50 STAT3 для G4-аптамеров

3.3.3.2 Влияние G4-аптамеров на активность TOP1

Одним из ключевых ферментов, участвующих в процессе синтеза ДНК, является TOP1. Этот фермент позволяет разрешать топологические затруднения, возникающие в узлах деления, и поддерживать негативную сверхсирализацию ДНК на необходимом уровне для жизнедеятельности клетки. Поэтому было решено для каждого G4-аптамера проверить влияние на активность данного фермента и соотнести его с влияние на процесс репликации и жизнедеятельности клетки.

Ингибирующая способность набора G4-олигонуклеотидов в отношении TOP1 была определена при помощи анализа электрофореграмм продуктов релаксации pUC19 под действием сверхспирализованной плазмиды фермента. Метод TOP1 основан различной определения активности на подвижности сверхспирализованной и релаксированной форм плазмидной ДНК в агарозном геле под действием электрического тока. Плазмидные ДНК (пДНК) находятся в сверхспирализованном состоянии, то есть имеют более компактную форму и быстрее движутся под действием электрического тока, так как легче проходят сквозь поры в агорозном геле.

ТОР1 вносит одноцепочечный разрыв в двойную нить ДНК, снимает сверхспирализацию и сшивает разорванную нить. Таким образом активность

фермента можно оценить по соотношению релаксированной и сверхспирализованной форм плазмидной ДНК на электрофореграмме. Типичная электрофореграмма представлена на рисунке 21. Как видно из рисунка, интенсивность сигнала сверхспирализованной ДНК (зеленая стрелка) растет с увеличением концентрации олигонуклеотидов в реакционной смеси, в то время как доля релаксированной формы снижается. Степень ингибирования фермента определялась как отношение количества сверхспирализованной формы плазмидной ДНК к суммарному количеству плазмидной ДНК.





Для каждой концентрации олигонуклеотида вычислялась степень ингибирования TOP1, после чего строилась зависимость степени ингибирования от логарифма концентрации олигонуклеотида, по которой находили значение IC₅₀ для каждого из олигонуклеотидов (Рисунок 22).



Рисунок 22 - кривые ингибирования активности TOP1 G4-аптамерами G4-SHP2 и G4-TGT соответственно

Олигонуклеотиды, неспособные формировать G4 (Random и Macugen) не подавляли ферментативную активность TOP1 (Рисунок 23).



Рисунок 23 - Ингибирование релаксации плазмиды pUC19 TOP1 с помощью олигонуклеотидов А) Macugene Б) Random

Все изученные в работе G-богатые олигонуклеотиды в той или иной степени проявляют ингибирующее действие в отношении TOP1 (Таблица 8). Наибольший ингибирующий эффект оказывает олигонуклеотид G4-SHP2 –для него IC50 составило 0,03 µM.

Название олигонуклеотида	IC ₅₀ , μM	Название олигонуклеотида	IC ₅₀ , μM		
G4-SHP2	$0,030 \pm 0,005$	G4-STAT3	$0,57{\pm}0,07$		
G4-TGT	$0,038 \pm 0,008$	AsGGG	$0,71 \pm 0,09$		
G4-SP1	$0,06 \pm 0,01$	AS1411	4,8±1,1		
G4-CCC	0,13±0,03	G4-TOP1	74		
G4-VEGF	$0,24 \pm 0,08$	Random	-		
G4-NCL	$0,25 \pm 0,08$				

Таблица 8 - Значения ІС50 исследуемых олигонуклеотидов для ТОР1

3.3.3.3 Ингибирование синтеза ДНК (репликация) под действием Gбогатых олигонуклеотидов

Так как G4 узнаются хеликазами, активность которых необходима в первую очередь при репликации, далее была изучена способность G-богатых олигонуклеотидов ингибировать репликацию ДНК. Интенсивность репликации

оценивали на клеточной культуре MCF-7 по интенсивности включения ³Н-тимидина во вновь синтезированную ДНК.

Клетки, которые находятся в S-стадии деления, интенсивно захватывают ³Hтимидин и включают его в новые синтезируемые нити ДНК. Таким образом, по интенсивности радиоактивного сигнала, накопленного за единицу времени культурой клеток, можно относительно оценить количество делящихся и *de novo* образовавшихся клеток. Так как тимидин не участвует в процессе синтеза PHK, интенсивность транскрипции не влияет уровень сигнала и не вносит погрешность в измерения.

Результаты исследования представлены в таблице 9. Все изученные G4олигонуклеотиды обнаружили способность подавлять репликацию. При этом олигонуклеотид с рендомной последовательностью не влиял на интенсивность захвата тимидина, то есть на процесс синтеза ДНК. Из всего набора олигонуклеотид AsGGG оказывал наиболее значимое влияние на интенсивность репликации. Данный олигонуклеотид подавлял синтез ДНК *de novo* на 88%.

Таблица 9 - Подавление репликации ДНК под действием G-богатых олигонуклеотидов (оценивалось по включению H3-тимидина)

Олигонуклеоти	Ингибирование
д	репликации, %
AsGGG	88 ± 2 %
G4-TGT	87 ± 3 %
G4-SHP2	85 ± 4 %
G4-CCC	$79\pm7\%$
G4-SP1	79 ± 2 %
G4-VEGF	77 ± 5 %

Олигонуклеоти	Ингибирование
д	репликации, %
G4-NCL	72 ± 5 %
G4-STAT3	67 ± 9 %
G4-TOP1	22 ± 8 %
Random	$0\pm8\%$
AS1411	77 ± 4 %

3.3.3.4 Влияние пула G-богатых олигонуклеотидов на жизнеспособность клеток линий молочной железы

Для определения наличия биологического эффекта на клетку каждого из отобранных олигонуклеотидов, было проведено сравнение их влияния на жизнедеятельность опухолевой и условно-нормальной линии клеток молочной железы.

Цитотоксичность исследуемых G4-аптамеров была оценена для двух клеточных линий: аденокарциномы молочной железы и иммортализованного эпителия молочной железы (MCF-7 и MCF-10A соответственно) с помощью MTT-теста, основанного на колориметрическом определении метаболической активности клеток по восстановлению тетразола в пурпурный формазан.

Клетки инкубировали с различными концентрациями G4-олигонуклеотидов, предварительно прошедшими отжиг в буфере для формирования G4 (см. материалы и методы, буфер A), в течение 72 часов. После этого проводили обработку МТТ и через 4 часа снимали сигнал оптической плотности при 570 нм на спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Scientific). Далее строили кривую зависимости процента выживших клеток от концентрации добавленного олигонуклеотида (от 0,05 до 20 µM), и по графику кривой вычисляли IC50 - концентрацию олигонуклеотида, при котором выживает 50% клеток. Суммарная информация по результатам оценки влияния аптамеров на жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста, проведенного на линиях клеток MCF-7 и MCF-10A, представлена в таблице 10.

Таблица 10 - Цитотоксичность исследуемых G4-аптамеров для двух клеточных линий: МСF-7 (линия клеток РМЖ) и МСF-10А (условно нормальные клетки молочной железы)

Название олигонуклеотида	IC50 (MCF-7), мкМ	IC50 (MCF-10A), мкМ
AsGGG	$0,05 \pm 0,02$	6±1
G4-CCC	$0,060 \pm 0,013$	8±1
G4-TGT	$0,\!18 \pm 0,\!04$	12±2

Название олигонуклеотида	IC50 (MCF-7), мкМ	IC50 (MCF-10A), мкМ			
G4-STAT3	$0,\!2 \pm 0,\!04$	>20			
AS1411	$0,57 \pm 0,13$	16±2			
G4-VEGF	$0,8\pm0,2$	7±1			
G4-NCL	3,9±0,4	>20			
G4-SHP2	3,1±0,1	Отсутствие токсического действия			
G4-TOP1	>20	>20			
G4-SP1	>20	>20			
Random	_	>20			

Продолжение таблицы 10

Олигонуклеотиды расположены в таблице 10 в соответствии с уменьшением цитотоксической концентрации. Наиболее цитотоксичный олигонуклеотид в исследуемомой группе - AsGGG (IC50 $0,05 \pm 0,02 \mu$ M). Олигонуклеотид Random не оказал влияния на жизнеспособность клеточных линий MCF-7 и MCF-10A. Полный анализ и обсуждение полученных результатов приведен в разделе обсуждение результатов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое распространение G4-мотивов как в геномной ДНК [227], так и в некодирующих РНК [228], их функциональная значимость в регулировании важнейших биологических процессах объясняют существование в клетке целого ряда белков, функционирование которых связано с распознаванием данной альтернативной структуры [229]. Специфическое связывание таких белков с G4 приводит к изменению их функциональной активности. На этом основано действие G4-аптамеров, экзогенных G-богатых олигонуклеотидов, способных формировать G4. Попадая в клетку, они связываются с соответствующими ферментами и ингибируют их активность. В результате нарушения биохимических процессов, в которые включены эти белки, может наблюдаться цитотоксический эффект [230].

К настоящему моменту в ряде исследований, описанных в обзоре литературы, были выявлены белки-мишени противоопухолевой терапии, высокоселективно связывающие G4-олигонуклеотиды, а именно:

- VEGF-A165 [174] (фактор роста эндотелия сосудов, сигнальный белок, вырабатываемый клетками опухоли для стимулирования ангиогенеза);

- SHP2 [136] (сигнальная фосфатаза, ингибирование которой приводит к одновременному ингибированию нескольких пролиферативных сигнальных путей, активированных в опухолевой клетке),

- SP1 [73] (транскрипционный фактор, контролирующий экспрессию многих пропролиферативных генов),

- STAT3 [224] (транскрипционный фактор, финальный участник JAK-STAT сигнального пути, активированного в клетках злокачественных образований различного генеза),

- нуклеолин [40, 225] (многофункциональный белок, количество данного белка на поверхности злокачественных клеток во много раз превышает количество мембранного нуклеолина в клетках нормальных тканей) - TOP1 [127] (фермент, отвечающий за поддержание необходимого топологического состояния ДНК).

В соответствующих исследования приводятся доказательства того, что ингибирующая активность G4-аптамеров обуславливается именно формированием структуры G-квадруплекса, а не наличием гуанин-богатой последовательности.

Специфичность взаимодействия белков с G-квадруплексами объясняется особой пространственной конформацией последних. Схожие структурные паттерны G-квадруплексов дают основание предположить, что они могут распознаваться не только «целевым» белком, но и какими-либо другими G4-связывающими белками. Таким образом, в данное исследование ставило перед собой цель выявить плейотропные эффекты G4-аптамеров и определить их закономерности. Для этого были определены и сопоставлены между собой следующие характеристики: физикосвойства G4-аптамеров, химические ИХ влияние на активность TOP1 И фактора STAT3, транскрипционного влияние процесс репликации на И жизнеспособность опухолевых клеток.

4.1 Характеристика наиболее распространенного G4-мотива

По современной научной литературы, G4-мотивы данным широко распространены в геноме человека и играют важную роль в регулировании внутриклеточных процессов за счет их распознавания и связывания регуляторными белками клетки. Так как данное исследование ставило перед собой цель выявить наличие плейотропного эффекта G4-аптамеров, важным дополнением к списку G4наиболее аптамеров G4-олигонуклеотид, представляющий собой стал распространенный G4-мотив в геноме человека.

Количество G4-мотивов в геноме по разным оценкам достигает от 375 000 до 560 000, и важно было определить существуют ли G4-мотивы с одинаковыми последовательностями, расположенные в разных участках генома, оценить их количество и определить последовательность.

82

Оказалось, что в геноме существует ограниченное число G4-мотивов со схожими последовательностями. То есть большинство G4-мотивов, расположенных в промоторных областях генов, обладают уникальными последовательностями. Однако, существует ограниченное число G4-мотивов, которые встречаются в промоторах более чем 10 генов. Была выявлена схема последовательностей десяти G4-мотивов, каждый из которых, предшествует более чем сорока генам (Рисунок 24).



Рисунок 24 - Распределение наиболее распространённых G4-мотивов в геноме

Интересно отметить, что петли в наиболее распространенных последовательностях не превышают 3 нуклеотидов, при этом последовательности с длиной петли в 1 нуклеотид являются наиболее распространенными.

Наиболее распространенным G4-мотивом является мотив GGGNGGGNGGGNGGG (3131313). Он был выявлен в промоторной области 106 генов (Приложение 1), большинство из которых обладают пропролиферативной активностью.

Существование повторяющихся G4-мотивов в геноме подтверждается работой [231]. В отличие от подхода, использованного в представленном диссертационном исследовании, авторы провели полногеномный анализ, и обнаружили, что неуникальные G4-мотивы (последовательностей с частотой встречаемости более 1) представляют от 22% до 26% от всех G4-мотивов. Некоторые из этих последовательностей повторяются более 30 000 раз, хотя среднее значение составляет шесть повторений на неуникальную последовательность.

Выявленная последовательность содержит 3 гуанина в каждом G-тракте и по одному нуклеотиду между G-трактами, что согласуется с работой [209], в которой обнаружено, что петли длиной в 1 нуклеотид наиболее распространены среди последовательностей с количеством гуанинов в G-тракте от 3 до 5. Авторы также обнаружили, что последовательности типа (3-5)1(3-5)1(3-5)1(3-5) чаще всего встречаются в геноме человека – более 47 000 раз. Различие в числе найденных последовательностей объясняется тем, что авторы анализировали полную последовательность генома, а не только промоторные области генов.

Очевидно, что при использовании других алгоритмов поиска, результат может измениться. Однако, в представленном исследовании показана принципиальная возможность нахождения одинаковых G4-мотивов в промоторах разных генов, что позволяет предположить наличие механизма кластерной регуляции экспрессии генов за счет формирования G-квадруплексов и их распознавания регуляторными белками. В рамках подхода рационального дизайна G4-аптамеров предполагается основываться на мотивах, которые наиболее часто встречаются в геноме [232]. Поэтому на основании проведенного биоинформатического анализа, в список изучаемых в данной работе G4-аптамеров, был включен дополнительный G4-олигонуклеотид, соответствующий мотиву 3133313, так как по данным [209] такая последовательность встречается в геноме более 9000 раз.

Далее была оценена термодинамическая стабильность G-квадруплекса, формируемого данным G4-мотивом.

В качестве модельной системы был выбран олигонуклеотид последовательностью GGGTGGGTGGGTGGGTGGG, в котором петли представляли собой остатки тимина. Термодинамическая стабильность G-квадруплекса, формируемого такими G4-мотивами, была измерена при помощи УФ-плавления и составила свыше 87°C. Это значительно превышает термическую стабильность дуплекса и позволяет утверждать, что такие последовательности, способны формировать стабильные G4 *in vivo*.

Полученные результаты и их интерпретация согласуются с данными литературы [233]. Значение температуры плавления согласуется с оценками других исследователей. Так в работе [233] стабильность данного G-квадруплекса составила 82°С, что ниже значения, полученного в рамках данной работы. Однако при сравнении стоит учитывать йонный состав буфера, в котором проводилось плавление, так как температура плавления G-квадруплекса прямо пропорционально зависит от концентрации стабилизирующих ионов (K+, Na+) [234].

Методом КД было установлено, что данный G-квадруплекс относится к параллельному типу. Это наблюдение соотносится с многочисленными исследованиями, в которых также изучалась структура данного модельного олигонуклеотида. [235] Показано, что последовательность аптамера к интегразе ВИЧ-1, содержащая (GGGT)n – мотив, также формирует параллельный квадруплекс [236]. Этот же вывод подтвержден методом ЯМР-анализа [237].

85

4.2 Конформационная характеристика структуры G4-аптамеров

После подтверждения возможности формирования G-квадруплексов в геноме и определения последовательности наиболее распространенного G4-мотива, из результатов опубликованных научных исследований была отобрана группа G4-аптамеров к белкам-таргетам противоопухолевой терапии (Таблица 11). Для каждого G4-аптамера было необходимо проанализировать взаимосвязь структуры и биологической активности, и после сопоставить данные для всех G4-аптамеров чтобы доказать наличие плейотропного эффекта.

Нами была изучена способность каждого из отобранных G4-аптамеров формировать G-квадруплекс, а также его конформация методом кругового дихроизма. Большинство из полученных спектров кругового дихроизма свидетельствуют о формировании G4-аптамерами G-квадруплексов. Исключение составили олигонуклеотиды Macugen и Random, чья последовательность заведомо не позволяет им формировать G-квадруплексы. Спектры кругового дихроизма, полученные для данных олигонуклеотидов, (Рисунок 18 А), представляют собой типичный вид спектров неструктурированных олигонуклеотидов, имеющих небольшой максимум около 275 нм и минимум около 250 нм.

Симметричные олигонуклеотиды G4-TGT и G4-ССС формируют параллельные структуры G4, что согласуется с современными представлениями о влиянии последовательности G4-мотива на структуру G-квадруплекса. Так в исследовании влияния длины петель на конформацию G-квадруплекса было установлено, что последовательности, имеющие один нуклеотид между гуаниновыми трактами преимущественно, складываются в параллельные структуры [238]. Наличие двух однонуклеотидных петель приводит к формированию параллельного G-квадруплекса вне зависимости от длины третьей петли [239].

Так в исследовании [3] систематично исследовали влияние длины и состава каждой из петель на стабильность и конформацию G-квадруплекса. Увеличение длины петель приводит к большему конформационному разнообразию, а также к

формированию межмолекулярных структур. Последовательности, не имеющие однонуклеотидных петель, преимущественно формируют квадруплексы смешанного типа (параллельного и антипараллельного).

Олигонуклеотиды G4-STAT3, G4-SHP2, AS1411 и AsGGG также формируют Gквадруплексы параллельного типа. Все они имеют в составе однонуклеотидные петли, которые не допускают конформационного разнообразия структуры G-квадруплексов.

Для олигонуклеотидов G4-NCL и G4-VEGF характерна смесь параллельной и антипараллельной форм G4, что также согласуется с их последовательностью.

Олигонуклеотиды G4-TOP1 и G4-SP1 формируют антипараллельные G4.

Таким образом, было подтверждено, что все выбранные в данной работе G4аптамеры формируют G-квадруплексы различных конформаций (Таблица 11).

Таблица 11 - тип структуры G-квадруплексов, формируемых изученными G4аптамерами

G4-аптамер	Структура G4-аптамера				
	Буфер А	Буфер А-Li			
G4-STAT3	Параллельный тип	Параллельный тип			
G4-TGT	Параллельный тип	Параллельный тип			
G4-CCC	Параллельный тип	Параллельный тип			
AS1411	Параллельный тип	Un			
G4-SHP-2	Параллельный тип	Параллельный тип			
G4-VEGF	Гибридный тип	Неструктурированный олигонуклеотид			
G4-NCL	Гибридный тип	Гибридный тип			
G4-TOP1	Антипараллельный тип	Неструктурированный олигонуклеотид			
G4-SP1	Антипараллельный тип	Неструктурированный олигонуклеотид			
Random	Неструктурированный олиг	Неструктурированный олигонуклеотид			

4.3 Ингибирование активности транскрипционного фактора STAT3

Олгигонуклеотиды можно разделить на две группы – подавляющие транскрипционную активность STAT3 (Рисунок 25) и G-богатые олигонуклеотиды, такой активностью не обладающие (Рисунок 26). Контрольный олигонуклеотид случайной последовательности (Random) также не обладал способностью ингибировать активность STAT3.



Рисунок 25 - Влияние G-богатых олигонуклеотидов на транскрипционную активность STAT3



Рисунок 26 - Отсутствие влияние длинных G-богатых олигонуклеотидов на транскрипционную активность STAT3

Олигонуклеотиды, неспособные ингибировать активность STAT3, обладают более длинными последовательностями: их длина превышает 23 нуклеотида. Кроме того, эти олигонуклеотиды в основном не содержат повторяющихся мотивов, но несут в себе тракты более четырех гуанозинов подряд (G4-NCL, G4-TOP1, G4-SHP2, G4-VEGF, Random).

G4-аптамеры, способные ингибировать STAT3 (G4-STAT3, AsGGG, As1411, G4-CCC, G4-SP1, G4-TGT), более короткие – их длина не превышала 21 нуклеотида. Исключение составляет As1411 и модифицированный AsGGG. G-квадруплексы, сформированные данными олигонуклеотидами, обладали параллельной ориентацией цепей ДНК в квадруплексном коре. Все олигонуклеотиды проявили ингибирующую активность в микромолярных концентрациях (данные представлены в таблице 6). Наилучшим ингибитором транскрипционной активности STAT3 является олигонуклеотид G4-STAT3, IC50=15±3 µM. Самым слабым ингибирующим действием из группы обладал олигонуклеотид G4-SP1, IC50=140±30 µM (почти в 10 раз больше).

4.4 Ингибирование топоизомеразы I

Как видно из таблицы 5, большинство олигонуклеотидов, исследуемых в работе ингибируют TOP1 в нано- или микромолярных концентрациях. Высокоселективный ингибитор TOP1 камптотецин, применяемый в клинической онкологии, способен ингибировать TOP1 в концентрациях от 0,1 до 10 µM, что на порядок выше, чем лучший ингибитор TOP1 из анализируемого набора – G4-SHP2. Для него IC50 составила 0,03µM.

Олигонуклеотид случайной последовательности Random, а также Macugen не проявили ингибиторного эффекта на TOP1 в изучаемом диапазоне концентраций.

Самыми сильными ингибиторами TOP1 оказались олигонуклеотиды с наибольшей длиной G-трактов в своих последовательностях. Таким образом, можно предположить, что увеличение количества G-тетрад повышает ингибиторную способность олигонуклеотидов.

4.5 Ингибирующее действие G4 на синтез ДНК

Все исследуемые олигонуклеотиды в концентрации 10 μМ подавляли включение H3-тимидина во вновь синтезированную цепь ДНК (Рисунок 27, Таблица 9). В число наиболее сильных блокаторов матричного синтеза ДНК вошли олигонуклеотиды AsGGG и G4-TGT, G4- SHP2 блокирующие репликацию на 88, 87 и 85 % соответственно. Наименее выраженным эффектом в отношении синтеза ДНК обладал олигонуклеотид G4-TOP1, снижение уровня репликации составило 22% относительно контроля. Контрольный олигонуклеотид случайной последовательности (Random) не обладал способностью подавлять репликацию.

Тот факт, что концентрации, при которых данные олигонуклеотиды проявляли цитотоксический эффект в отношении клеток MCF-7 значительно ниже 10 μM (концентрация, при которой изучалось ингибирование репликации) свидетельствует о многофакторном механизме реализации цитотоксического действия.



Рисунок 27 - Влияние G-богатых олигонуклеотидов на репликацию (по включению H3-тимидина)

Полученные результаты согласуют я с данными современных исследований. Известно, что некоторые G-богатые олигонуклеотиды способны ингибировать репликацию [240]. В работе [241] указывалась способность олигонуклеотида AS1411, а также 3 его модификаций, оказывать ингибирующее действие на синтез ДНК как *in vivo*, так и *in vitro*. При этом влияние на реализацию процессов синтеза РНК и белка отсутствует. Продемонстрирована способность AS1411 при концентрации 10 µM полностью подавлять *de novo* синтез ДНК в клетках DU145 после 24 часов инкубации.

4.6 Влияние на жизнеспособность клеток рака молочной железы

Так как все отобранные в работе G4-аптамеры являются ингибиторами белковпотенциальных мишений противоопухолевой терапии, после изучения физикохимических свойств G4-аптамеров, демонстрации плейотропности их действия и ингибирующего действия на многофакторный процесс репликации ДНК для части из них, важно было оценить их влияние на жизнеспособность опухолевых и условно нормальных клеток. Для этого была проведена серия экспериментов с использованием МТТ-теста на опухолевых клетках МСF-7 (аденокарцинома молочной железы) и условно нормальных клетках МСF10А (иммортализованные клетки нормальной ткани молочной железы). Полученные кривые выживаемости клеток МСF-7 представлены на рисунке 28.



Рисунок 28 - Зависимость выживаемости клеток МСF-7 при обработке G4аптамерами в концентрациях от 0,05 до 10 µМ

Девять из двенадцати исследуемых олигонуклеотидов проявили дозозависимый цитотоксический эффект в отношении опухолевой линии MCF-7. Исключение составили олигонуклеотиды G4-TOP1, G4-SP1, и Random, не оказавшие в рабочих концентрациях (до 20µM) эффекта на жизнеспособность клеток линии MCF7.

Анализ конформационных особенностей эффективных G4-аптамеров свидетельствует о том, что большинство G4-аптамеров, обладающих

цитотоксическим эффектом в отношении опухолевых клеток MCF-7, имеют параллельную конформацию (Таблица 12). Цитотоксический эффект G4-аптамеров на условно-нормальные клетки линию MCF-10A проявлялся существенно слабее. Только для олигонуклеотидов As1411, G4-VEGF, AsGGG, G4-CCC, G4-TGT значение IC50 находилось в диапазоне используемых концентраций и в каждом из случаев превышала 6 µM.

Таблица 12 - Влияние типа структуры G4-аптамеров на жизнеспособность клеток линии MCF-7 (линия клеток аденокарциномы молочной железы) и MCF-10A (условно нормальные клетки молочной железы)

	Тип структуры Антипролиферативная активность G4-аптамеро							
G4-аптамер		Клеточная лини	ия МС F-7	Клеточная линия MCF-10A				
		IC50, μM	pIC50	IC50, μM	pIC50			
G4-STAT3	параллельная	0.20 ± 0.04	6.70	> 50	<4.30			
G4-TGT	параллельная	0.18 ± 0.04	6.74	12 ± 2	4.92			
G4-CCC	параллельная	0.06 ± 0.01	7.22	8 ± 1	5.10			
AS1411 параллельная		0.57 ± 0.13	6.24	16 ± 2	4.80			
G4-SHP2	параллельная	3.10 ± 0.11	5.51	Стим.	-			
G4-VEGF	смешанная	0.80 ± 0.21	6.08	7 ± 1	5.15			
G4-NCL	смешанная	3.90 ± 0.41	5.41	> 50	<4.30			
G4-TOP1	анти-	> 50	<4.30	> 50	<4.30			
	параллельная							
G4-SP1	анти-	> 50	<4.30	> 50	<4.30			
	параллельная							
Random		No	-	No	-			

По своему эффекту на жизнедеятельность клеток двух анализируемых линий клеток изучаемые олигонуклеотиды можно разделить на 4 группы (Таблица 13).

Таблица 13 - Влияние G4-аптамеров на жизнеспособность клеток линии MCF-7 (линия клеток аденокарциномы молочной железы) и MCF-10A (условно нормальные клетки молочной железы)

	Эффект на линию МСГ-7	Эффект на линию МСГ-10А		
Группа 1 G4-STAT3 G4-NCL	Цитотоксичный эффект	Нет цитотоксичного эффекта		
Группа 2 AsGGG G4-CCC G4-TGT AS1411 G4-VEGF	Цитотоксичный эффект	Слабый цитотоксичный эффект		
Группа 3 G4-SHP2	Нет цитотоксичного эффекта	Стимулирующий эффект		
Группа 4 G4-SP1 G4-TOP1 Randon	Нет цитотоксичного эффекта	Нет цитотоксичного эффекта		

Группа 1:

Олигонуклеотиды, объединенные в данную группу являются цитотоксичными по отношению к злокачественной клеточной линии MCF-7, однако не влияют на жизнеспособность клеток MCF10A. Цитотоксическое действие в отношении MCF-7 имело дозозависимый характер.

Группа 2:

Многие из олигонуклеотидов, проявивших цитотоксичность на клеточной линии опухолевых клеток, имели тенденцию к угнетению жизнедеятельности линии нормальных клеток. К этой группе относятся следующие олигонуклеотиды: AsGGG, G4-CCC, G4-TGT, As1411, G4-VEGF. Цитотоксичность также имела дозозависимый характер, причем токсичные концентрации для линии нормальных клеток были значительно выше, чем для злокачественных. Так наиболее цитотоксичный олигонуклеотид из данной группы AsGGG в 12 раз более цитотоксичен в отношении

опухолевой клеточной линии (IC50 составила 0,05 μМ и 6 μМ для клеток линии MCF-7 и MCF-10A соответственно) [242].

<u>Группа 3:</u>

G4-SHP2 проявлял значительно меньшую цитотоксичность относительно линии опухолевых клеток MCF-7, однако на линии нормальных клеток наблюдался обратный эффект: после обработки олигонуклеотидами, клеточная линия MCF-10A демонстрировала повышенный уровень пролиферации по сравнению с контрольным образцом. Данный эффект не является желательным, поскольку агенты, стимулирующие клеточный рост сами по себе обладают канцерогенным потенциалом.

Группа 4:

Олигонуклеотиды из четвертой группы не оказали цитотоксического эффекта ни на раковые, ни на условно-нормальные клетки в используемых концентрациях (от 0,01 до 20 µM). В эту группу попали олигонуклеотиды G4-TOP1, G4-SP1 и олигонуклеотид со случайной последовательностью Random.

Таким образом, всего три из двенадцати исследуемых олигонуклеотидов не проявили цитотоксической активности по отношению к опухолевым клеткам, а именно, G4-TOP1, G4-SP1 и олигонуклеотид случайной последовательности Random. Наибольший цитотоксический эффект был обнаружен для AsGGG олигонуклеотида. Его IC50 составила 0,05 ± 0,02 µM для опухолевых клеток MCF-7, при этой концентрации выживало более 90% клеток условно нормальной линии MCF-10A.

Интересно отметить, что в случае олигонуклеотида As1411 (IC50 (MCF-7)=0.57µM) и его измененного аналога AsGGG (IC50(MCF-7)=0.05 µM) наблюдается следующая закономерность - увеличение числа тетрад с 2ух (As1411) до 3ex (AsGGG) привело к 10-ти кратному увеличению цитотоксического эффекта в отношении клеточной линии MCF-7.

На данный момент не существует единого механизма, объясняющего цитотоксичный эффект гуанин-богатых олигонуклеотидов. В актуальных

современных исследованиях данный эффект объясняется через три основных процесса:

- ингибирование белка или белкового комплекса, играющего важную роль в процессах жизнедеятельность клетки

- взаимодействие с G4-олигонуклеотидами по принципу действия антисмыслового олигонуклетотида с определенными последовательностями ДНК в промоторной области ключевого гена и ингибирование его экспрессии.

- взаимодействие G4-олигонуклеотида по принципу действия анти-смыслового олигонуклетотида с последовательностями теломерных повторов, что приводит к подавлению процессинга теломер и клеточной гибели [150].

В большинстве современных работ время, необходимое для достижения цитотоксического эффекта G4-аптамерами в отношении линий опухолевых клеток превышает 48 часов и обычно составляет от 72 до 144 часов [243, 244].

Так VEGFq - гуанин-богатый нуклеотид, представляющий собой 32ух нуклеотидный G4-мотив, расположенный в промоторном регионе гена VEGF-A, подавляет экспрессию гена VEGF-A через связывание С-богатой с последовательностью промоторного региона VEGF-А. Это событие блокирует синтез мРНК гена VEGF-A, что приводит к подавлению активности ERK и AKT сигнальных путей и остановке клеточного деления VEGF-зависимых линий клеток рака легкого (Н1299 и Н1944 - клеточные линии немелкоклеточного рака легкого, Н3255 – клетки Calu-1 сквамозного рака легкого И клетки эпидермоидной карциномы). Цитотоксичность наблюдали при концентрации начиная от 3 µM при времени инкубирования инкубации 144 часа [243].

G4-T-oligo, олигонуклеотид с последовательностью (TTAGGG)₄, подавляет синтез мРНК гена hTERT, обратной транскриптазы теломеразы человека (каталитическая субъединица теломеразы) [244].

4.7 Анализ плейотропного эффекта G4-аптамеров

Сводные данные, полученные в ходе представленного исследования суммированы в таблице 14.

Было обнаружено, G-квадруплексы, способные что складываться преимущественно В параллельную форму, обладают более выраженной антипролиферативной активностью в отношении опухолевых клеток. Это можно объяснить тем фактом, что большинство G4-мотивов, расположенных в промоторных областях генов, складываются в параллельную форму, и G4-связывающие белки, вовлеченные в регуляцию клеточной пролиферации, репликации, транскрипции и других клеточных процессов, преимущественно распознают именно такой тип структур.

Установлено, что олигонуклеотиды AS1411, G4-SP1, G4-STAT3 и G4-TGT, G4-ССС значительно снижают транскрипционную активность фактора STAT3, а также, что все аптамеры из анализируемого набора эффективно ингибируют активность TOP1. Таким образом, был подтвержден мульти-направленный эффект исследуемых G4-аптамеров. STAT3 как транскрипционный фактор регулирует экспрессию нуклеолина в клетках. Таким образом, ингибирование STAT3 аптамером к нуклеолину AS1411 не может быть следствием взаимодействия AS1411 с нуклеолином [148]. К тому же нуклеолин не влияет на активность TOP1 несмотря на то, что он способен связывать данный фермент [245]. То есть обнаруженные ингибирующие эффекты AS1411 в отношении активности STAT3 и TOP1 не связаны с его способностью подавлять активность нуклеолина.

Интересно заметить, что активность STAT3 подавляется G4-SP1 аптамером. Этот аптамер был выбран исходя из работы Райбера [73], основываясь на SP1распознающей последовательности в промоторе гена *c-Kit*. Данная последовательность является редким примером двухтетрадного антипараллельного квадруплекса [73]. Таблица 14 – сводная таблица изученных биологических эффектов G4-аптамеров и тип их структуры, Р- параллельный тип, Н – гибридный (3+1) или же смесь конформеров, А – антипараллельный, Un - неструктурированный олигонуклеотид

	Структура G4- аптамера		Ингибирование STAT3		Ингибирование ТОР1		Ингиби- рование	Антипролиферативная активность G4-аптамеров (72 h)			
G4- аптамер							репли- кации, % (10 µM, 24 h)	MCF-7 cells		MCF-10A cells	
	Buffer A	Buffer A-Li	IC50, μM	pIC50, μΜ	IC50, μM	pIC50		IC50, μM	pIC50	IC50, μΜ	pIC50
G4-STAT3	Р	Р	15 ± 3	4.82	0.57 ± 0.07	6.24	67 ± 9	0.20 ± 0.04	6.70	> 50	<4.30
G4-TGT	Р	Р	85 ± 14	4.07	0.04 ± 0.01	7.42	87 ± 3	0.18 ± 0.04	6.74	12 ± 2	4.92
G4-CCC	Р	Р	130 ± 21	3.89	0.13 ± 0.03	6.89	79 ± 7	0.06 ± 0.01	7.22	8 ± 1	5.10
AS1411	Р	Un	47 ± 11	4.33	4.80 ± 1.11	5.32	77 ± 4	0.57 ± 0.13	6.24	16 ± 2	4.80
G4-SHP2	Р	Р	No	-	0.03 ± 0.01	7.20	84 ± 2	3.10 ± 0.11	5.51	Стим.	-
G4-VEGF	Н	Un	No	-	0.24 ± 0.08	6.62	77 ± 5	0.80 ± 0.21	6.08	7 ± 1	5.15
G4-NCL	Н	Н	No	-	0.25 ± 0.08	6.60	72 ± 5	3.90 ± 0.41	5.41	> 50	<4.30
G4-TOP1	А	Un	No	-	>74	<4.13	22 ±8	> 50	<4.30	> 50	<4.30
G4-SP1	А	Un	140 ± 30	3.85	0.06 ± 0.01	7.22	79 ± 2	> 50	<4.30	> 50	<4.30
Random	Un	Un	No	-	No	-	No	No	-	No	-

Транскрипционный фактор SP1 связывает ДНК при помощи цинкового пальца и способен распознавать различные формы G4 [73]. В то же время STAT3 контролирует экспрессию SP1, а не наоборот. Значит ингибирование активности STAT3 не может быть следствием связывания SP1 с G4-SP1-аптамером. К тому же, белки, которые находятся под контролем SP1, связывают и ингибируют активность STAT3 [246]. Там образом, ингибирование SP1 должно приводить к увеличению активности STAT3. В этом контексте полученные результаты ясно показывают сильное ингибирование STAT3 с помощью G4-SP1-аптамера и подтверждают прямое взаимодействие между STAT3 и G4-SP1. Это можно объяснить частично распределением сайтов связывания SP1 и STAT3 в регуляторных областях генов, которые могут регулироваться обоими этими транскрипционными факторами совместно. [246]. Полученные результаты дают еще одно объяснение наблюдаемых перекрестных помех SP1 и STAT3 посредством взаимодействия этих двух белков с той же структурой G4.

Взаимодействие G4- аптамеров, разработанных против STAT3, VEGF, SHP2, SP1, нуклеолина с TOP1 и подавление ее активности, согласуется с тем, что этот фермент распознает G4 различных топологий. Известно, что наиболее эффективными ингибиторами TOP1 являются олигонуклеотиды, содержащие протяженные Gтракты, независимо от того, складываются ли они в G4-структуру или нет [247]. Представленные результаты согласуются с опубликованными данными: аптамер G4-SHP2, который содержит несколько четырех и пяти-гуаниновых трактов, был самым сильным ингибитором ТОР1. Для AS1411, который содержит только два остатка в G-трактах, наблюдалось снижение ингибирующей гуанозиновых способности более чем в 100 раз. Следует отметить, что G4-TOP1, который содержит четыре 2-И 3-п-G-трактаты, фланкированные дуплекс-образующими последовательностями (Таблица 2), и был предложен Shuai и др. [127] как наиболее эффективный ингибитор ТОР1, показал очень слабую ингибирующую активность в используемых условиях.

Мультинаправленное действие G4-STAT3 (продемонстрированное связыванием G4-STAT3 не только с белком STAT3, но и с TOP1) поддерживаются другими исследованиями. Было показано, что этот аптамер взаимодействует с интегразой ВИЧ-1 [236] и рецептором к интерлейкину-6 [248].

Следует отметить, что была обнаружена корреляция влияния G4-аптамеров на репликацию ДНК и их влияние на активность TOP1. Четыре G4-аптамера (G4-TGT, G4-SP1, G4-SHP2 и G4-CCC), которые ингибировали TOP1 наиболее эффективно, по сравнению с другими аптамерами, также приводили к максимальному снижению включения 3H-тимидина (87-79%) в растущей цепи ДНК. Напротив, G4-TOP1аптамер продемонстрировал худший ингибирующий эффект на активность TOP1 по сравнению с остальными аптамерами G4 представленного в работе набора, и также ингибировал репликацию ДНК хуже, чем другие (Таблица 14).

В заключительной части представленного исследования, показав G4, мультинаправленные эффекты нескольких аптамеров был проведен сравнительный анализ интегральной антипролиферативной активности аптамеров на клетках MCF-7 аденокарциномы молочной железы иммортализованных И эпителиальных клеток MCF-10A молочной железы. Семь аптамеров анализируемого набора (G4-STAT3, G4-CCC, AS1411, G4-TGT, G4-NCL, G4-VEGF и G4-SHP2) имели значительно более высокие антипролиферативные эффекты в отношении опухолевых клеток. Принимая во внимание плейотропные свойства G4- аптамеров и их избирательную антипролиферативную активность против опухолевых клеток, можно рассматривать аптамеры G4 как перспективные агенты мультитаргетной терапии опухолевых заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Прогресс в понимании молекулярных механизмов канцерогенеза и прогрессии опухоли обеспечил развитие современной таргетной химиотерапии. Открытие различных компонентов сигнальных путей клетки, важных в передаче митогенных и аниапоптотических сигналов, а также в обеспечении других ключевых характеристик опухолевых клеток, позволило выявить белки-мишени таргетной терапии. В то же время разработка таргетных препаратов, их синтез и внедрение в клиническую практику представляет собой достаточно трудозатратный и дорогостоящий процесс. Белковые таргетные препараты отличаются низкой стабильностью, быстро инактивируются, а в организме подвергаются деградации. Низкомолекулярные таргетные препараты достаточно быстро выводятся из организма. Кроме того, прием таргетных препаратов, оказывается эффективным лишь для части онкопациентов, имеющих соответствующие генетические и эпигенетические нарушения, а в силу лействие эффективным гетерогенности опухоли, ИХ оказывается лишь непродолжительное время. При этом могут наблюдаться аллергические, токсические и другие побочные эффекты. Все это свидетельствует о необходимости поиска новых путей химиотерапевтического лечения злокачественных новообразований.

Определенными преимуществами в создании таргетных препаратов имеют аптамеры – олигонуклеотиды, характеризующиеся определенной вторичнеой структурой, что обеспечивает их взаимодействие с соответствующими белками клетки. Особое внимание среди таких олигонуклеотидов заслуживают аптамеры, способные формировать G-квадруплексы, G4-аптамеры. Разработка G4-аптамеров не отличается особой сложностью, их синтез быстр и дешев, они отличаются относительной стабильностью и низкой иммуногенностью. В настоящее время считается доказанным, что последовательности, формирующие G-квадруплексы, имеют преимущественное распространение в промоторах онкогенов, что может представлять основу для кластерной регуляции экспрессии генов. Однако,

101

биологические эффекты G4-аптамеров изучены недостаточно. Решению данной проблемы и была посвящена представленная работа.

В соответствии с поставленными задачами был проведен анализ особенностей функционирования G4-мотивов в геноме клетки и возможности избирательного ингибирования ИМИ опухолевых клеток. С использованием современных биоинформатических подходов был проведен анализ распространенности G4мотивов в геноме человека, а затем проведен анализ структурных особенностей наиболее распространенных в геноме человека G4-квадруплексов с помощью УФплавления и кругового дихроизма. На основании опубликованных данных по G4разработанных качестве ингибиторов определенных белков, аптамерам, В представляющих мишени таргетной терапии, был отобран ряд наиболее перспективных из них и проанализирована плейотропность их действия, оценен их эффект на репликацию ДНК и их цитотоксическое действие. В заключительной части исследования было проведено сопоставление биологических эффектов G4-аптамеров и их структуры.

Представленное исследование расширяет существующие представления о функционировании G-квадруплексов в качестве регуляторного элемента пропролиферативных процессов и апоптоза.

Полученные результаты позволяют сформировать следующие выводы:

1. В геноме присутствует более 10 наиболее распространенных последовательностей, способных формировать G-квадруплексы, каждая из которых присутствует более чем в 20 генах. Наиболее распространённая последовательность формирует параллельный G-квадруплекс.

2. G4-аптамеры, разработанные к различным белкам-мишеням таргетной терапии, обладают плейотропным механизмом действия в клетке. G4-аптамеры AS1411, G4-SP1, G4-STAT3 и G4-TGT, G4-CCC значительно снижают транскрипционную активность фактора STAT3. Все G4-аптамеры, использованные в представленном исследовании эффективно ингибируют активность TOP1

3. G4-аптамеры блокируют процесс репликации в клетках линии MCF-7. Наилучшим ингибитором репликации является олигонуклеотид AsGGG, который подавлял репликацию опухолевых клеток молочной железы MCF-7 на 88% в концентрации 10 µM.

4. Цитотоксичность всех изученных в данной работе биологически активных G4-аптамеров оказалась значительно выше в отношении опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 по сравнению с иммортализованными клетками нормальной ткани молочной железы MCF-10A.

5. Преимущественной конформацией биологически активных G4-аптамеров является параллельная. Количество гуанинов в тракте влияет на цитотоксичность G4-аптамеров (оптимальное – 3G).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

104

CCND1 – циклин D1

CCND2 – циклин D2

EDTА – этилендиаминтетрауксусная кислота

EGFR – эпидермальный фактор роста (Epidermal growth factor)

EWS - РНК-связывающий белок EWS

FKBP51 – белок 51, связывающий FK506 (FK506 binding protein)

FMRP - человеческий ген, кодирующий белок, называемый хрупким белком

умственной отсталости Х

FXR1P - Белок 1, связанный с синдромом умственной отсталости Fragile X

G4 – G-квадруплекс

HIF1 α – фактор, индуцируемого гипоксией 1 α (Hypoxia induced factor 1 α)

hnRNP G - Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин G

і-мотив – интеркаляционная форма ДНК

IFN – интерферон

Ig –молекулы полииммуноглобулина

IL – интерлейкины

LPS – липополисахарид ы

MRE11 - Белок репарации двойных разрывов нитей

NF-kB – ядерный фактор каппа В

NGS – полногеномное секвенирование нового поколения (Next generation sequencing)

NMP1 - Nucleophosmin 1

РАRР – полимераза поли(АДФ-рибозы)

Pat1 - ДНК-топоизомераза 2-ассоциированный белок РАТ1

 $PBS-\varphi oc \varphi op ho$ -солевой буфер

РІЗК- Фосфоиндол-З-киназа

Rpl27 – рибосомальный белок L27

RpS6 – рибосомный белок S6

- SDS натрий додецилсульфат
- SP1 Фактор транскрипции SP1

STAT – белки из семейства передачи сигнала и активации транскрипции (Signal transducer and activator of transcription)

- TLS РНК-связывающий белок FUS / TLS
- TNFa фактор некроза опухоли α
- ТОР1 топоизомераза 1
- VEGF фактор роста сосудов (Vascular-endotelial growth factor)
- ВИЧ-1 вирус иммунодефицита человека
- ДМСО диметилсульфоксид
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- мРНК матричная РНК
- МТТ 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ел)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
- РНК рибонуклеиновая кислота
- СОХ-2 циклооксигеназа 2
- ЯМР ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Biffi, G. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells
 / G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian // Nat Chem. – 2013. – T. 5, №
 3. – C. 182-6.

Gellert, M. Helix formation by guanylic acid / M. Gellert, M.N. Lipsett,
 D.R. Davies // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1962. – T. 48. – C. 2013-8.

3. Guedin, A. How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability /
A. Guedin, J. Gros, P. Alberti, J.L. Mergny // Nucleic Acids Res. – 2010. – T. 38, № 21. –
C. 7858-68.

4. Esposito, V. A topological classification of G-quadruplex structures / V. Esposito,
A. Galeone, L. Mayol, G. Oliviero, A. Virgilio, L. Randazzo // Nucleosides Nucleotides
Nucleic Acids. - 2007. - T. 26, № 8-9. - C. 1155-9.

5. Hardin, C. C. Thermodynamic and kinetic characterization of the dissociation and assembly of quadruplex nucleic acids / C.C. Hardin, A.G. Perry, K. White // Biopolymers. – 2000. – T. 56, N_{2} 3. – C. 147-94.

Burge, S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure / S. Burge,
 G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, S. Neidle // Nucleic Acids Res. – 2006. – T. 34, №
 19. – C. 5402-15.

7. Gaynutdinov, T. I. Structural polymorphism of intramolecular quadruplex of human telomeric DNA: effect of cations, quadruplex-binding drugs and flanking sequences / T.I. Gaynutdinov, R.D. Neumann, I.G. Panyutin // Nucleic Acids Res. – 2008. – T. 36, № 12. – C. 4079-87.

Tran, P. L. Stability of telomeric G-quadruplexes / P.L. Tran, J.L. Mergny,
 P. Alberti // Nucleic Acids Res. – 2011. – T. 39, № 8. – C. 3282-94.

9. Mathias, J. Thermal stability of quadruplex primers for highly versatile isothermal DNA amplification / J. Mathias, R. Okyere, L. Lomidze, D. Gvarjaladze, K. Musier-Forsyth, B. Kankia // Biophys Chem. – 2014. – T. 185. – C. 14-8.

10. Hatzakis, E. Thermodynamic stability and folding kinetics of the major G-quadruplex and its loop isomers formed in the nuclease hypersensitive element in the human c-Myc promoter: effect of loops and flanking segments on the stability of parallel-stranded intramolecular G-quadruplexes / E. Hatzakis, K. Okamoto, D. Yang // Biochemistry. – 2010. – T. 49, N_{2} 43. – C. 9152-60.

11. Sun, D. The importance of negative superhelicity in inducing the formation of Gquadruplex and i-motif structures in the c-Myc promoter: implications for drug targeting and control of gene expression / D. Sun, L.H. Hurley // J Med Chem. – 2009. – T. 52, N_{2} 9. – C. 2863-74.

12. Zeraati, M. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells /
M. Zeraati, D.B. Langley, P. Schofield, A.L. Moye, R. Rouet, W.E. Hughes, T.M. Bryan,
M.E. Dinger, D. Christ // Nat Chem. – 2018. – T. 10, № 6. – C. 631-637.

13. Martadinata, H. Structure of propeller-type parallel-stranded RNA Gquadruplexes, formed by human telomeric RNA sequences in K+ solution / H. Martadinata, A.T. Phan // J Am Chem Soc. – 2009. – T. 131, \mathbb{N} 7. – C. 2570-8.

14. Zhang, D. H. Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors / D.H. Zhang, T. Fujimoto, S. Saxena, H.Q. Yu, D. Miyoshi, N. Sugimoto // Biochemistry. – 2010. – T. 49, № 21. – C. 4554-63.

15. Zhao, Y. Extensive selection for the enrichment of G4 DNA motifs in transcriptional regulatory regions of warm blooded animals / Y. Zhao, Z. Du, N. Li // FEBS Lett. – 2007. – T. 581, № 10. – C. 1951-6.

16. Huppert, J. L. Structure, location and interactions of G-quadruplexes / J.L. Huppert // FEBS J. – 2010. – T. 277, № 17. – C. 3452-8.

17. Hansel-Hertsch, R. DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential / R. Hansel-Hertsch, M. Di Antonio, S. Balasubramanian // Nat Rev Mol Cell Biol. -2017. - T. 18, No 5. -C. 279-284.

18. Wu, F. Genome-wide analysis of DNA G-quadruplex motifs across 37 species provides insights into G4 evolution / F. Wu, K. Niu, Y. Cui, C. Li, M. Lyu, Y. Ren, Y. Chen, H. Deng, L. Huang, S. Zheng, L. Liu, J. Wang, Q. Song, H. Xiang, Q. Feng // Commun Biol. – 2021. – T. 4, № 1. – C. 98.

19. Puig Lombardi, E. A guide to computational methods for G-quadruplex prediction
/ E. Puig Lombardi, A. Londono-Vallejo // Nucleic Acids Res. – 2020. – T. 48, № 1. – C. 115.

20. Piazza, A. Non-Canonical G-quadruplexes cause the hCEB1 minisatellite instability in Saccharomyces cerevisiae / A. Piazza, X. Cui, M. Adrian, F. Samazan, B. Heddi, A.T. Phan, A.G. Nicolas // Elife. – 2017. – T. 6.

21. Lightfoot, H.L. The diverse structural landscape of quadruplexes / H.L. Lightfoot,
T. Hagen, N. J. Tatum, J. Hall // FEBS Lett. – 2019. – T. 593, № 16. – C. 2083-2102.

22. Capra, J.A. G-quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in Saccharomyces cerevisiae / J.A. Capra, K. Paeschke, M. Singh, V.A. Zakian // PLoS Comput Biol. – 2010. – T. 6, № 7. – C. e1000861.

23. Marsico, G. Whole genome experimental maps of DNA G-quadruplexes in multiple species / G. Marsico, V.S. Chambers, A.B. Sahakyan, P. McCauley, J.M. Boutell, M.D. Antonio, S. Balasubramanian // Nucleic Acids Res. – 2019. – T. 47, № 8. – C. 3862-3874.

24. Patel, D.J. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics / D.J. Patel, A.T. Phan, V. Kuryavyi // Nucleic Acids Res. – 2007. – T. 35, № 22. – C. 7429-55.

25. Varshney, D. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes /
D. Varshney, J. Spiegel, K. Zyner, D. Tannahill, S. Balasubramanian // Nat Rev Mol Cell
Biol. – 2020. – T. 21, № 8. – C. 459-474.

26. Lago, S. Promoter G-quadruplexes and transcription factors cooperate to shape the cell type-specific transcriptome / S. Lago, M. Nadai, F.M. Cernilogar, M. Kazerani,
H. Dominiguez Moreno, G. Schotta, S.N. Richter // Nat Commun. – 2021. – T. 12, № 1. –
C. 3885.

27. Amrane, S. Formation of pearl-necklace monomorphic G-quadruplexes in the human CEB25 minisatellite / S. Amrane, M. Adrian, B. Heddi, A. Serero, A. Nicolas, J.L. Mergny, A.T. Phan // J Am Chem Soc. – 2012. – T. 134, № 13. – C. 5807-16.

28. Sawaya, S. Microsatellite tandem repeats are abundant in human promoters and are associated with regulatory elements / S. Sawaya, A. Bagshaw, E. Buschiazzo, P. Kumar, S. Chowdhury, M.A. Black, N. Gemmell // PLoS One. – 2013. – T. 8, № 2. – C. e54710.

29. Neidle, S. Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer / S. Neidle // FEBS J. – 2010. – T. 277, N_{2} 5. – C. 1118-25.

30. Brooks, T.A. Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters / T.A. Brooks, S. Kendrick, L. Hurley // FEBS J. – 2010. – T. 277, № 17. – C. 3459-69.

31. Katapadi, V.K. Potential G-quadruplex formation at breakpoint regions of chromosomal translocations in cancer may explain their fragility / V.K. Katapadi, M. Nambiar, S.C. Raghavan // Genomics. – 2012. – T. 100, № 2. – C. 72-80.

32. Mani, P. Genome-wide analyses of recombination prone regions predict role of DNA structural motif in recombination / P. Mani, V.K. Yadav, S.K. Das, S. Chowdhury // PLoS One. – 2009. – T. 4, № 2. – C. e4399.

33. Lexa, M. Quadruplex-forming sequences occupy discrete regions inside plant LTR retrotransposons / M. Lexa, E. Kejnovsky, P. Steflova, H. Konvalinova, M. Vorlickova, B. Vyskot // Nucleic Acids Res. – 2014. – T. 42, № 2. – C. 968-78.

34. Kuryavyi, V. Solution structure of a unique G-quadruplex scaffold adopted by a guanosine-rich human intronic sequence / V. Kuryavyi, D.J. Patel // Structure. – 2010. – T. 18, № 1. – C. 73-82.

35. Zizza, P. Intragenic G-quadruplex structure formed in the human CD133 and its biological and translational relevance / P. Zizza, C. Cingolani, S. Artuso, E. Salvati,

A. Rizzo, C. D'Angelo, M. Porru, B. Pagano, J. Amato, A. Randazzo, E. Novellino,
A. Stoppacciaro, E. Gilson, G. Stassi, C. Leonetti, A. Biroccio // Nucleic Acids Res. – 2016.
– T. 44, № 4. – C. 1579-90.

36. Huppert, J. LG-quadruplexes: the beginning and end of UTRs / J. Huppert, A. Bugaut, S. Kumari, S. Balasubramanian // Nucleic Acids Res. – 2008. – T. 36, № 19. – C. 6260-8.

37. Balasubramanian, S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? / S. Balasubramanian, L.H. Hurley, S. Neidle // Nat Rev Drug Discov. -2011. - T. 10, No 4. - C. 261-75.

38. Eddy, J. G4 motifs correlate with promoter-proximal transcriptional pausing in human genes / J. Eddy, A.C. Vallur, S. Varma, H. Liu, W.C. Reinhold, Y. Pommier, N. Maizels // Nucleic Acids Res. – 2011. – T. 39, № 12. – C. 4975-83.

39. Eddy, J. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome / J. Eddy, N. Maizels // Nucleic Acids Res. – 2006. – T. 34, № 14. – C. 3887-96.

40. Gonzalez, V. Identification and characterization of nucleolin as a c-myc Gquadruplex-binding protein / V. Gonzalez, K. Guo, L. Hurley, D. Sun // J Biol Chem. – 2009. – T. 284, № 35. – C. 23622-35.

41. Russo Krauss, I. Duplex-quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer / I. Russo Krauss, A. Pica, A. Merlino, L. Mazzarella, F. Sica // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. – 2013. – T. 69, № Pt 12. – C. 2403-11.

42. Phan, A.T. Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction / A.T. Phan, V. Kuryavyi, J.C. Darnell, A. Serganov, A. Majumdar, S. Ilin, T. Raslin, A. Polonskaia, C. Chen, D. Clain, R.B. Darnell, D.J. Patel // Nat Struct Mol Biol. – 2011. – T. 18, № 7. – C. 796-804.

43. Spiridonova, V.A. A family of DNA aptamers with varied duplex region length that forms complexes with thrombin and prothrombin / V.A. Spiridonova, K.V. Barinova,

K.A. Glinkina, A.V. Melnichuk, A.A. Gainutdynov, I.V. Safenkova, B.B. Dzantiev // FEBS Lett. – 2015. – T. 589, № 16. – C. 2043-9.

44. Huang, Z.L. Identification of G-Quadruplex-Binding Protein from the Exploration of RGG Motif/G-Quadruplex Interactions / Z.L. Huang, J. Dai, W.H. Luo, X.G. Wang, J.H. Tan, S.B. Chen, Z.S. Huang // J Am Chem Soc. – 2018. – T. 140, № 51. – C. 17945-17955.

45. Takahama, K. Specific binding of modified RGG domain in TLS/FUS to Gquadruplex RNA: tyrosines in RGG domain recognize 2'-OH of the riboses of loops in Gquadruplex / K. Takahama, T. Oyoshi // J Am Chem Soc. – 2013. – T. 135, № 48. – C. 18016-9.

46. Chen, M.C. Structural basis of G-quadruplex unfolding by the DEAH/RHA helicase DHX36 / M.C. Chen, R. Tippana, N.A. Demeshkina, P. Murat, S. Balasubramanian, S. Myong, A.R. Ferre-D'Amare // Nature. – 2018. – T. 558, № 7710. – C. 465-469.

47. Kuryavyi, V. RecA-binding pilE G4 sequence essential for pilin antigenic variation forms monomeric and 5' end-stacked dimeric parallel G-quadruplexes / V. Kuryavyi, L.A. Cahoon, H.S. Seifert, D.J. Patel // Structure. – 2012. – T. 20, № 12. – C. 2090-102.

48. Gallo, A. Structure of nucleophosmin DNA-binding domain and analysis of its complex with a G-quadruplex sequence from the c-MYC promoter / A. Gallo, C. Lo Sterzo, M. Mori, A. Di Matteo, I. Bertini, L. Banci, M. Brunori, L. Federici // J Biol Chem. – 2012. – T. 287, № 32. – C. 26539-48.

49. Hayashi, T. Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: crucial importance of water entropy in molecular recognition / T. Hayashi, H. Oshima, T. Mashima, T. Nagata, M. Katahira, M. Kinoshita // Nucleic Acids Res. – 2014. – T. 42, № 11. – C. 6861-75.

50. Heddi, B. Insights into G-quadruplex specific recognition by the DEAH-box helicase RHAU: Solution structure of a peptide-quadruplex complex / B. Heddi, V.V.

Cheong, H. Martadinata, A.T. Phan // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – T. 112, № 31. – C. 9608-13.

51. Boyer, A.S. The human specialized DNA polymerases and non-B DNA: vital relationships to preserve genome integrity / A.S. Boyer, S. Grgurevic, C. Cazaux, J.S. Hoffmann // J Mol Biol. – 2013. – T. 425, № 23. – C. 4767-81.

52. Haeusler, A.R. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease / A.R. Haeusler, C.J. Donnelly, G. Periz, E.A. Simko, P.G. Shaw, M.S. Kim, N.J. Maragakis, J.C. Troncoso, A. Pandey, R. Sattler, J.D. Rothstein, J. Wang // Nature. – 2014. – T. 507, № 7491. – C. 195-200.

53. Ivanov, P. G-quadruplex structures contribute to the neuroprotective effects of angiogenin-induced tRNA fragments / P. Ivanov, E. O'Day, M.M. Emara, G. Wagner, J. Lieberman, P. Anderson // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – T. 111, № 51. – C. 18201-6.

54. Paeschke, K. DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the Saccharomyces cerevisiae Pif1 DNA helicase / K. Paeschke, J.A. Capra, V.A. Zakian // Cell. – 2011. – T. 145, № 5. – C. 678-91.

55. Castillo Bosch, P. FANCJ promotes DNA synthesis through G-quadruplex structures / P. Castillo Bosch, S. Segura-Bayona, W. Koole, J.T. van Heteren, J.M. Dewar, M. Tijsterman, P. Knipscheer // EMBO J. – 2014. – T. 33, № 21. – C. 2521-33.

56. Aguilera, A. Causes of genome instability / A. Aguilera, T. Garcia-Muse // Annu Rev Genet. – 2013. – T. 47. – C. 1-32.

57. Lopes, J. G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication / J. Lopes, A. Piazza, R. Bermejo, B. Kriegsman, A. Colosio, M.P. Teulade-Fichou, M. Foiani, A. Nicolas // EMBO J. – 2011. – T. 30, № 19. – C. 4033-46.

58. Ribeyre, C. The yeast Pif1 helicase prevents genomic instability caused by Gquadruplex-forming CEB1 sequences in vivo / C. Ribeyre, J. Lopes, J.B. Boule, A. Piazza, A. Guedin, V.A. Zakian, J.L. Mergny, A. Nicolas // PLoS Genet. – 2009. – T. 5, № 5. – C. e1000475. 59. Paeschke, K. Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs / K. Paeschke, M.L. Bochman, P.D. Garcia, P. Cejka, K.L. Friedman, S.C. Kowalczykowski, V.A. Zakian // Nature. – 2013. – T. 497, № 7450. – C. 458-62.

60. Byrd, A.K. A parallel quadruplex DNA is bound tightly but unfolded slowly by pifl helicase / A.K. Byrd, K.D. Raney // J Biol Chem. – 2015. – T. 290, № 10. – C. 6482-94.

61. Hou, X.M. Molecular mechanism of G-quadruplex unwinding helicase: sequential and repetitive unfolding of G-quadruplex by Pif1 helicase / X.M. Hou, W.Q. Wu, X.L. Duan, N.N. Liu, H.H. Li, J. Fu, S.X. Dou, M. Li, X.G. Xi // Biochem J. – 2015. – T. 466, № 1. – C. 189-99.

62. Duan, X.L. G-quadruplexes significantly stimulate Pif1 helicase-catalyzed duplex DNA unwinding / X.L. Duan., N.N. Liu, Y.T. Yang, H.H. Li, M. Li, S.X. Dou, X.G. Xi // J Biol Chem. – 2015. – T. 290, № 12. – C. 7722-35.

63. Chen, M.C. Insights into the mechanism of a G-quadruplex-unwinding DEAHbox helicase / M.C. Chen, P. Murat, K. Abecassis, A.R. Ferre-D'Amare, S. Balasubramanian // Nucleic Acids Res. – 2015. – T. 43, № 4. – C. 2223-31.

64. Wu, W.Q. BLM unfolds G-quadruplexes in different structural environments through different mechanisms / W.Q. Wu, X.M. Hou, M. Li, S.X. Dou, X.G. Xi // Nucleic Acids Res. – 2015. – T. 43, № 9. – C. 4614-26.

65. Yatsunyk, L.A. "Nano-oddities": unusual nucleic acid assemblies for DNA-based nanostructures and nanodevices / L.A. Yatsunyk, O. Mendoza, J.L. Mergny // Acc Chem Res. – 2014. – T. 47, № 6. – C. 1836-44.

66. Nakanishi, C. G-quadruplex in cancer biology and drug discovery / C. Nakanishi,
H. Seimiya // Biochem Biophys Res Commun. – 2020. – T. 531, № 1. – C. 45-50.

67. Mergny, J.L. DNA Quadruple Helices in Nanotechnology / J.L. Mergny, D. Sen // Chem Rev. – 2019. – T. 119, № 10. – C. 6290-6325.

68. Shida, T. Quadruplex formation of oligonucleotides containing G clusters and their nuclease resistance / T. Shida, M. Suda, J. Sekiguchi // Nucleic Acids Symp Ser. – 1997. № 37. – C. 129-30.

69. Cao, Z. Nuclease resistance of telomere-like oligonucleotides monitored in live cells by fluorescence anisotropy imaging / Z. Cao, C.C. Huang, W. Tan // Anal Chem. – 2006. – T. 78, № 5. – C. 1478-84.

70. Chiarella, S. Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA / S. Chiarella, A. De Cola, G.L. Scaglione, E. Carletti, V. Graziano, D. Barcaroli, C. Lo Sterzo, A. Di Matteo, C. Di Ilio, B. Falini, A. Arcovito, V. De Laurenzi, L. Federici // Nucleic Acids Res. – 2013. – T. 41, N_{2} 5. – C. 3228-39.

71. Simone, R. G-quadruplexes: Emerging roles in neurodegenerative diseases and the non-coding transcriptome / R. Simone, P. Fratta, S. Neidle, G.N. Parkinson, A.M. Isaacs // FEBS Lett. – 2015. – T. 589, № 14. – C. 1653-68.

72. Cogoi, S. HRAS is silenced by two neighboring G-quadruplexes and activated by MAZ, a zinc-finger transcription factor with DNA unfolding property / S. Cogoi, A.E. Shchekotikhin, L.E. Xodo // Nucleic Acids Res. – 2014. – T. 42, № 13. – C. 8379-88.

73. Raiber, E.A. A non-canonical DNA structure is a binding motif for the transcription factor SP1 in vitro / E.A. Raiber, R. Kranaster, E. Lam, M. Nikan, S. Balasubramanian // Nucleic Acids Res. -2012. -T. 40, No 4. -C. 1499-508.

74. Wolfe, A.L. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer / A.L. Wolfe, K. Singh, Y. Zhong, P. Drewe, V.K. Rajasekhar, V.R. Sanghvi, K.J. Mavrakis, M. Jiang, J.E. Roderick, J. Van der Meulen, J.H. Schatz, C.M. Rodrigo, C. Zhao, P. Rondou, E. de Stanchina, J. Teruya-Feldstein, M.A. Kelliher, F. Speleman, J.A. Porco Jr., J. Pelletier, G. Ratsch, H.G. Wendel // Nature. – 2014. – T. 513, № 7516. – C. 65-70.

75. Tosoni, E. Nucleolin stabilizes G-quadruplex structures folded by the LTR promoter and silences HIV-1 viral transcription / E. Tosoni, I. Frasson, M. Scalabrin, R.

Perrone, E. Butovskaya, M. Nadai, G. Palu, D. Fabris, S.N. Richter // Nucleic Acids Res. – 2015. – T. 43, № 18. – C. 8884-97.

76. Wickramasinghe, C.M. Contributions of the specialised DNA polymerases to replication of structured DNA / C.M. Wickramasinghe, H. Arzouk, A. Frey, A. Maiter, J.E. Sale // DNA Repair (Amst). – 2015. – T. 29. – C. 83-90.

77. Eddy, S. Evidence for the kinetic partitioning of polymerase activity on Gquadruplex DNA / S. Eddy, L. Maddukuri, A. Ketkar, M.K. Zafar, E.E. Henninger, Z.F. Pursell, R.L. Eoff // Biochemistry. – 2015. – T. 54, № 20. – C. 3218-30.

78. Zheng, K.W. Detection of genomic G-quadruplexes in living cells using a small artificial protein / K.W. Zheng, J.Y. Zhang, Y.D. He, J.Y. Gong, C.J. Wen, J.N. Chen, Y.H. Hao, Y. Zhao, Z. Tan // Nucleic Acids Res. – 2020. – T. 48, № 20. – C. 11706-11720.

79. Giraldo, R. The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA / R. Giraldo, D. Rhodes // EMBO J. – 1994. – T. 13, N_{2} 10. – C. 2411-20.

80. Li, B. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution / B. Li,
S. Oestreich, T. de Lange // Cell. - 2000. - T. 101, № 5. - C. 471-83.

81. Chaires, J.B. Human POT1 unfolds G-quadruplexes by conformational selection /
J.B. Chaires, R.D. Gray, W.L. Dean, R. Monsen, L.W. DeLeeuw, V. Stribinskis, J.O. Trent
// Nucleic Acids Res. – 2020. – T. 48, № 9. – C. 4976-4991.

82. Mullins, M.R. POT1-TPP1 Binding and Unfolding of Telomere DNA Discriminates against Structural Polymorphism / M.R. Mullins, M. Rajavel, W. Hernandez-Sanchez, M. de la Fuente, S.M. Biendarra, M.E. Harris, D.J. Taylor // J Mol Biol. – 2016. – T. 428, № 13. – C. 2695-708.

83. Brazda, V. Strong preference of BRCA1 protein to topologically constrained non-B DNA structures / V. Brazda, L. Haronikova, J.C. Liao, H. Fridrichova, E.B. Jagelska // BMC Mol Biol. – 2016. – T. 17, № 1. – C. 14.

84. Herviou, P. hnRNP H/F drive RNA G-quadruplex-mediated translation linked to genomic instability and therapy resistance in glioblastoma Le / P. Herviou, M. Bras, L.

Dumas, C. Hieblot, J. Gilhodes, G. Cioci, J.P. Hugnot, A. Ameadan, F. Guillonneau, E. Dassi, A. Cammas, S. Millevoi // Nat Commun. – 2020. – T. 11, № 1. – C. 2661.

85. Wang, Y.R. Replication protein A plays multifaceted roles complementary to specialized helicases in processing G-quadruplex DNA / Y.R. Wang, T.T. Guo, Y.T. Zheng, C.W. Lai, B. Sun, X.G. Xi, X.M. Hou // iScience. – 2021. – T. 24, № 5. – C. 102493.

86. Qureshi, M.H. Replication protein A unfolds G-quadruplex structures with varying degrees of efficiency / M.H. Qureshi, S. Ray, A.L. Sewell, S. Basu, H. Balci // J Phys Chem B. – 2012. – T. 116, № 19. – C. 5588-94.

87. Takahama, K. Regulation of telomere length by G-quadruplex telomere DNA- and TERRA-binding protein TLS/FUS / K. Takahama, A. Takada, S. Tada, M. Shimizu, K. Sayama, R. Kurokawa, T. Oyoshi // Chem Biol. – 2013. – T. 20, № 3. – C. 341-50.

88. Biffi, G. An intramolecular G-quadruplex structure is required for binding of telomeric repeat-containing RNA to the telomeric protein TRF2 / G. Biffi, D. Tannahill,
S. Balasubramanian // J Am Chem Soc. – 2012. – T. 134, № 29. – C. 11974-6.

89. Nishikawa, T. HnRNPA1 interacts with G-quadruplex in the TRA2B promoter and stimulates its transcription in human colon cancer cells / T. Nishikawa, Y. Kuwano, Y. Takahara, K. Nishida, K. Rokutan // Sci Rep. – 2019. – T. 9, N_{2} 1. – C. 10276.

90. Kruger, A.C. Interaction of hnRNP A1 with telomere DNA G-quadruplex structures studied at the single molecule level / A.C. Kruger, M.K. Raarup, M.M. Nielsen, M. Kristensen, F. Besenbacher, J. Kjems, V. Birkedal // Eur Biophys J. – 2010. – T. 39, № 9. – C. 1343-50.

91. Horvath, M.P. DNA G-quartets in a 1.86 A resolution structure of an Oxytricha nova telomeric protein-DNA complex / M.P. Horvath, S.C. Schultz // J Mol Biol. – 2001. – T. 310, № 2. – C. 367-77.

92. Hudson, J.S. Recognition and binding of human telomeric G-quadruplex DNA by unfolding protein 1 / J.S. Hudson, L. Ding, V. Le, E. Lewis, D. Graves // Biochemistry. – 2014. – T. 53, № 20. – C. 3347-56.

93. Arimondo, P.B. Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures / P.B. Arimondo, J.F. Riou, J.L. Mergny, J. Tazi, J.S. Sun, T. Garestier, C. Helene // Nucleic Acids Res. – 2000. – T. 28, № 24. – C. 4832-8.

94. Srivastava, M. Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene / M. Srivastava, O.W. McBride, P.J. Fleming, H.B. Pollard, A.L. Burns // J Biol Chem. – 1990. – T. 265, № 25. – C. 14922-31.

95. Soldatenkov, V.A. First evidence of a functional interaction between DNA quadruplexes and poly(ADP-ribose) polymerase-1 / V.A. Soldatenkov, A.A. Vetcher, T. Duka, S. Ladame // ACS Chem Biol. – 2008. – T. 3, № 4. – C. 214-9.

96. Chen, S. Mechanistic studies for the role of cellular nucleic-acid-binding protein (CNBP) in regulation of c-myc transcription / S. Chen, L. Su, J. Qiu, N. Xiao, J. Lin, J.H. Tan, T.M. Ou, L.Q. Gu, Z.S. Huang, D. Li // Biochim Biophys Acta. – 2013. – T. 1830, № 10. – C. 4769-77.

97. Scognamiglio, P.L. G-quadruplex DNA recognition by nucleophosmin: new insights from protein dissection / P.L. Scognamiglio, C. Di Natale, M. Leone, M. Poletto, L. Vitagliano, G. Tell, D. Marasco // Biochim Biophys Acta. – 2014. – T. 1840, № 6. – C. 2050-9.

98. Cogoi, S. MAZ-binding G4-decoy with locked nucleic acid and twisted intercalating nucleic acid modifications suppresses KRAS in pancreatic cancer cells and delays tumor growth in mice / S. Cogoi, S. Zorzet, V. Rapozzi, I. Geci, E.B. Pedersen, L.E. Xodo // Nucleic Acids Res. – 2013. – T. 41, N_{2} 7. – C. 4049-64.

99. Cogoi, S. The KRAS promoter responds to Myc-associated zinc finger and poly(ADP-ribose) polymerase 1 proteins, which recognize a critical quadruplex-forming GA-element / S. Cogoi, M. Paramasivam, A. Membrino, K.K. Yokoyama, L.E. Xodo // J Biol Chem. – 2010. – T. 285, № 29. – C. 22003-16.

100. Ehrat, E.A. G-quadruplex recognition activities of E. Coli MutS / E.A. Ehrat,
B.R. Johnson, J.D. Williams, G.M. Borchert, E.D. Larson // BMC Mol Biol. – 2012. – T. 13.
– C. 23.

101. Xiao, J. Mass spectrometric determination of ILPR G-quadruplex binding sites in insulin and IGF-2 / J. Xiao, L.B. McGown // J Am Soc Mass Spectrom. – 2009. – T. 20, № 11. – C. 1974-82.

102. Connor, A.C. Insulin capture by an insulin-linked polymorphic region Gquadruplex DNA oligonucleotide / A.C. Connor, K.A. Frederick, E.J. Morgan, L.B. McGown // J Am Chem Soc. – 2006. – T. 128, № 15. – C. 4986-91.

103. Quante, T. Mutant p53 is a transcriptional co-factor that binds to G-rich regulatory regions of active genes and generates transcriptional plasticity / T. Quante, B. Otto, M. Brazdova, I. Kejnovska, W. Deppert, G.V. Tolstonog // Cell Cycle. – 2012. – T. 11, № 17. – C. 3290-303.

104. Ma, D.L. Bioactive luminescent transition-metal complexes for biomedical applications / D.L. Ma, H.Z. He, K.H. Leung, D.S. Chan, C.H. Leung // Angew Chem Int Ed Engl. – 2013. – T. 52, № 30. – C. 7666-82.

105. He, H.Z. G-quadruplexes for luminescent sensing and logic gates / H.Z. He, D.S. Chan, C.H. Leung, D.L. Ma // Nucleic Acids Res. – 2013. – T. 41, № 8. – C. 4345-59.

106. Fernando, H. Selective recognition of a DNA G-quadruplex by an engineered antibody / H. Fernando, R. Rodriguez, S. Balasubramanian // Biochemistry. – 2008. – T. 47, № 36. – C. 9365-71.

107. Melko, M. Functional characterization of the AFF (AF4/FMR2) family of RNAbinding proteins: insights into the molecular pathology of FRAXE intellectual disability / M. Melko, D. Douguet, M. Bensaid, S. Zongaro, C. Verheggen, J. Gecz, B. Bardoni // Hum Mol Genet. – 2011. – T. 20, № 10. – C. 1873-85.

108. Bensaid, M. FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNAbinding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure / M. Bensaid, M. Melko, E.G. Bechara, L. Davidovic, A. Berretta, M.V. Catania, J. Gecz, E. Lalli, B. Bardoni // Nucleic Acids Res. – 2009. – T. 37, № 4. – C. 1269-79.

109. Khateb, S. Destabilization of tetraplex structures of the fragile X repeat sequence (CGG)n is mediated by homolog-conserved domains in three members of the hnRNP family

/ S. Khateb, P. Weisman-Shomer, I. Hershco, L.A. Loeb, M. Fry // Nucleic Acids Res. –
 2004. – T. 32, № 14. – C. 4145-54.

110. Khateb, S. The tetraplex (CGG)n destabilizing proteins hnRNP A2 and CBF-A enhance the in vivo translation of fragile X premutation mRNA / S. Khateb, P. Weisman-Shomer, I. Hershco-Shani, A.L. Ludwig, M. Fry // Nucleic Acids Res. – 2007. – T. 35, N_{2} 17. – C. 5775-88.

111. Meier, M. Binding of G-quadruplexes to the N-terminal recognition domain of the RNA helicase associated with AU-rich element (RHAU) / M. Meier, T.R. Patel, E.P. Booy, O. Marushchak, N. Okun, S. Deo, R. Howard, K. McEleney, S.E. Harding, J. Stetefeld, S.A. McKenna // J Biol Chem. – 2013. – T. 288, № 49. – C. 35014-27.

112. von Hacht, A. Identification and characterization of RNA guanine-quadruplex binding proteins / A. von Hacht, O. Seifert, M. Menger, T. Schutze, A. Arora, Z. Konthur, P. Neubauer, A. Wagner, C. Weise, J. Kurreck // Nucleic Acids Res. – 2014. – T. 42, № 10. – C. 6630-44.

113. Palma, E. Metal-Based G-Quadruplex Binders for Cancer Theranostics /
E. Palma, J. Carvalho, C. Cruz, A. Paulo // Pharmaceuticals (Basel). – 2021. – T. 14, № 7.

114. Mei, Y. TERRA G-quadruplex RNA interaction with TRF2 GAR domain is required for telomere integrity / Y. Mei, Z. Deng, O. Vladimirova, N. Gulve, F.B. Johnson, W.C. Drosopoulos, C.L. Schildkraut, P.M. Lieberman // Sci Rep. – 2021. – T. 11, N_{2} 1. – C. 3509.

115. Muniyappa, K. Yeast meiosis-specific protein Hop1 binds to G4 DNA and promotes its formation / K. Muniyappa, S. Anuradha, B. Byers // Mol Cell Biol. – 2000. – T. 20, N_{2} 4. – C. 1361-9.

116. Anuradha, S. Meiosis-specific yeast Hop1 protein promotes synapsis of doublestranded DNA helices via the formation of guanine quartets / S. Anuradha, K. Muniyappa // Nucleic Acids Res. – 2004. – T. 32, N_{2} 8. – C. 2378-85.

117. Chen, Y.T. Identification of CT46/HORMAD1, an immunogenic cancer/testis antigen encoding a putative meiosis-related protein / Y.T. Chen, C.A. Venditti, G. Theiler,

B.J. Stevenson, C. Iseli, A.O. Gure, C.V. Jongeneel, L.J. Old, A.J. Simpson // Cancer Immun. – 2005. – T. 5. – C. 9.

118. Ghosal, G. Saccharomyces cerevisiae Mre11 is a high-affinity G4 DNA-binding protein and a G-rich DNA-specific endonuclease: implications for replication of telomeric DNA / G. Ghosal, K. Muniyappa // Nucleic Acids Res. – 2005. – T. 33, № 15. – C. 4692-703.

119. Wu, W. HERC2 Facilitates BLM and WRN Helicase Complex Interaction with RPA to Suppress G-Quadruplex DNA / W. Wu, N. Rokutanda, J. Takeuchi, Y. Lai, R. Maruyama, Y. Togashi, H. Nishikawa, N. Arai, Y. Miyoshi, N. Suzuki, Y. Saeki, K. Tanaka, T. Ohta // Cancer Res. – 2018. – T. 78, № 22. – C. 6371-6385.

120. Richardson, A.E. G-Quadruplex Helicase DHX36/G4R1 Engages Nuclear Lamina Proteins in Quiescent Breast Cancer Cells / A.E. Richardson, Z.A. Zentz, A.E. Chambers, S.N. Sandwith, M.A. Reisinger, D.W. Saunders, J.D. Tompkins, A.D. Riggs, E.D. Routh, E.M. Rubenstein, M.A. Smaldino, J.P. Vaughn, R.A. Haney, P.J. Smaldino // ACS Omega. – 2020. – T. 5, № 38. – C. 24916-24926.

121. Huber, M.D. G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition / M.D. Huber, D.C. Lee, N. Maizels // Nucleic Acids Res. – 2002. – T. 30, № 18. – C. 3954-61.

122. Duxin, J.P. Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein / J.P. Duxin, B. Dao, P. Martinsson, N. Rajala, L. Guittat, J.L. Campbell, J.N. Spelbrink, S.A. Stewart // Mol Cell Biol. – 2009. – T. 29, № 15. – C. 4274-82.

123. Wang, J.C. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega / J.C. Wang // J Mol Biol. – 1971. – T. 55, № 3. – C. 523-33.

124. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond / Y. Pommier // Nat Rev Cancer. – 2006. – T. 6, № 10. – C. 789-802.

125. Moukharskaya, J. Topoisomerase 1 inhibitors and cancer therapy /
J. Moukharskaya, C. Verschraegen // Hematol Oncol Clin North Am. – 2012. – T. 26, № 3.
– C. 507-25, vii.

126. Marchand, C. Interaction of human nuclear topoisomerase I with guanosine quartet-forming and guanosine-rich single-stranded DNA and RNA oligonucleotides / C. Marchand, P. Pourquier, G.S. Laco, N. Jing, Y. Pommier // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, № 11. – C. 8906-11.

127. Shuai, L. Quadruplex-duplex motifs as new topoisomerase I inhibitors / L. Shuai,
M. Deng, D. Zhang, Y. Zhou, X. Zhou // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2010. –
T. 29, № 11. – C. 841-53.

128. Li, L. Nucleolin-targeting liposomes guided by aptamer AS1411 for the delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas / L. Li, J. Hou, X. Liu, Y. Guo, Y. Wu, L. Zhang, Z. Yang // Biomaterials. – 2014. – T. 35, № 12. – C. 3840-50.

129. Ogloblina, A.M. Parallel G-Quadruplexes Formed by Guanine-Rich Microsatellite Repeats Inhibit Human Topoisomerase I / A.M. Ogloblina, V.A. Bannikova, A.N. Khristich, T.S. Oretskaya, M.G. Yakubovskaya, N.G. Dolinnaya // Biochemistry (Mosc). – 2015. – T. 80, № 8. – C. 1026-38.

130. Barford, D. Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 / D. Barford, B.G. Neel // Structure. – 1998. – T. 6, № 3. – C. 249-54.

131. O'Reilly, A.M. Activated mutants of SHP-2 preferentially induce elongation of Xenopus animal caps / A.M. O'Reilly, S. Pluskey, S.E. Shoelson, B.G. Neel // Mol Cell Biol. – 2000. – T. 20, № 1. – C. 299-311.

132. Chan, G. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer / G. Chan,
D. Kalaitzidis, B.G. Neel // Cancer Metastasis Rev. – 2008. – T. 27, № 2. – C. 179-92.

133. Mohi, M.G. The role of Shp2 (PTPN11) in cancer / M.G. Mohi, B.G. Neel // Curr Opin Genet Dev. – 2007. – T. 17, № 1. – C. 23-30.

134. Zhang, J. Functions of Shp2 in cancer / J. Zhang, F. Zhang, R. Niu // J Cell Mol Med. – 2015. – T. 19, № 9. – C. 2075-83.

135. Parkin, A. Targeting the complexity of Src signalling in the tumour microenvironment of pancreatic cancer: from mechanism to therapy / A. Parkin, J. Man, P. Timpson, M. Pajic // FEBS J. – 2019. – T. 286, № 18. – C. 3510-3539.

136. Hu, J. A G-quadruplex aptamer inhibits the phosphatase activity of oncogenic protein Shp2 in vitro / J. Hu, J. Wu, C. Li, L. Zhu, W.Y. Zhang, G. Kong, Z. Lu, C.J. Yang // Chembiochem. – 2011. – T. 12, № 3. – C. 424-30.

137. Zhang, W.Y. Highly parallel single-molecule amplification approach based on agarose droplet polymerase chain reaction for efficient and cost-effective aptamer selection / W.Y. Zhang, W. Zhang, Z. Liu, C. Li, Z. Zhu, C.J. Yang // Anal Chem. – 2012. – T. 84, $N_{\rm P}$ 1. – C. 350-5.

138. Zhao, X.Q. Single-molecule force spectroscopic studies on intra- and intermolecular interactions of G-quadruplex aptamer with target Shp2 protein / X.Q. Zhao, J. Wu, J.H. Liang, J.W. Yan, Z. Zhu, C.J. Yang, B.W. Mao // J Phys Chem B. – 2012. – T. 116, № 37. – C. 11397-404.

139. Yue, P. Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? / P. Yue, J. Turkson // Expert Opin Investig Drugs. – 2009. – T. 18, № 1. – C. 45-56.

140. Aaronson, D.S. A road map for those who don't know JAK-STAT / D.S. Aaronson, C.M. Horvath // Science. – 2002. – T. 296, № 5573. – C. 1653-5.

141. Leonard, W.J. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction /
W.J. Leonard // Int J Hematol. – 2001. – T. 73, № 3. – C. 271-7.

142. Nagpal, J.K. Activation of STAT3 as one of the early events in tobacco chewingmediated oral carcinogenesis / J.K. Nagpal, R. Mishra, B.R. Das // Cancer. – 2002. – T. 94, N_{2} 9. – C. 2393-400.

143. Debnath, B. Small molecule inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein / B. Debnath, S. Xu, N. Neamati // J Med Chem. – 2012. – T. 55, № 15. – C. 6645-68.

144. Boise, L.H. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death / L.H. Boise, M. Gonzalez-Garcia, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nunez, C.B. Thompson // Cell. – 1993. – T. 74, № 4. – C. 597-608.

145. Niu, G. Constitutive STAT3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis / G. Niu, K.L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L.M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, H. Yu // Oncogene. – 2002. – T. 21, № 13. – C. 2000-8.

146. Buettner, R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention / R. Buettner, L.B. Mora, R. Jove // Clin Cancer Res. -2002. - T. 8, No 4. - C. 945-54.

147. Wang, T. Regulation of the innate and adaptive immune responses by STAT3 signaling in tumor cells / T. Wang, G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabrilovich, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll, H. Yu // Nat Med. – 2004. – T. 10, № 1. – C. 48-54.

148. Yu, H. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions / H. Yu, H. Lee, A. Herrmann, R. Buettner, R. Jove // Nat Rev Cancer. – 2014. – T. 14, № 11. – C. 736-46.

149. Oh, D.Y. Phase I Study of OPB-31121, an Oral STAT3 Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors / D.Y. Oh, S.H. Lee, S.W. Han, M.J. Kim, T.M. Kim, T.Y. Kim, D.S. Heo, M. Yuasa, Y. Yanagihara, Y.J. Bang // Cancer Res Treat. – 2015. – T. 47, № 4. – C. 607-15.

150. Weerasinghe, P. T40214/PEI complex: a potent therapeutics for prostate cancer that targets STAT3 signaling / P. Weerasinghe, Y. Li, Y. Guan, R. Zhang, D.J. Tweardy, N. Jing // Prostate. – 2008. – T. 68, № 13. – C. 1430-42.

151. Jing, N. Targeting STAT3 with G-quartet oligodeoxynucleotides in human cancer cells / N. Jing, Y. Li, X. Xu, W. Sha, P. Li, L. Feng, D.J. Tweardy // DNA Cell Biol. – 2003. – T. 22, № 11. – C. 685-96.

152. Zhu, Q. Computational study on mechanism of G-quartet oligonucleotide
T40214 selectively targeting STAT3 / Q. Zhu, N. Jing // J Comput Aided Mol Des. – 2007.
- T. 21, № 10-11. – C. 641-8.

153. Jing, N. Targeting signal transducer and activator of transcription 3 with Gquartet oligonucleotides: a potential novel therapy for head and neck cancer / N. Jing, Q. Zhu, P. Yuan, Y. Li, L. Mao, D.J. Tweardy // Mol Cancer Ther. – 2006. – T. 5, N_{2} 2. – C. 279-86.

154. Black, A.R. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer / A.R. Black, J.D. Black, J. Azizkhan-Clifford // J Cell Physiol. – 2001. – T. 188, № 2. – C. 143-60.

155. Chiefari, E. Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation? / E. Chiefari, A. Brunetti, F. Arturi, J.M. Bidart, D. Russo, M. Schlumberger, S. Filetti // BMC Cancer. – 2002. – T. 2. – C. 35.

156. Jiang, N.Y. Sp1, a new biomarker that identifies a subset of aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma / N.Y. Jiang, B.A. Woda, B.F. Banner, G.F. Whalen, K.A. Dresser, D. Lu // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2008. – T. 17, № 7. – C. 1648-52.

157. Guan, H. Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome / H. Guan, J. Cai, N. Zhang, J. Wu, J. Yuan, J. Li, M. Li // Int J Cancer. – 2012. – T. 130, № 3. – C. 593-601.

158. Wang, L. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer / L. Wang, D. Wei, S. Huang, Z. Peng, X. Le, T.T. Wu, J. Yao, J. Ajani, K. Xie // Clin Cancer Res. – 2003. – T. 9, № 17. – C. 6371-80.

159. Hang, J. Sp1 and COX2 expression is positively correlated with a poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma / J. Hang, H. Hu, J. Huang, T. Han, M. Zhuo, Y. Zhou, L. Wang, Y. Wang, F. Jiao, L. Wang // Oncotarget. – 2016. – T. 7, № 19. – C. 28207-17.

160. Jiang, W. High co-expression of Sp1 and HER-2 is correlated with poor prognosis of gastric cancer patients / W. Jiang, Z. Jin, F. Zhou, J. Cui, L. Wang, L. Wang // Surg Oncol. -2015. - T. 24, No 3. - C. 220-5.

161. Seznec, J. Therapeutic effects of the Sp1 inhibitor mithramycin A in glioblastoma
/ J. Seznec, B. Silkenstedt, U. Naumann // J Neurooncol. – 2011. – T. 101, № 3. – C. 365-77.

162. Sun, Y. Terameprocol (tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid), an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces radiosensitization in non-small cell lung carcinoma / Y. Sun, N.J. Giacalone, B. Lu // J Thorac Oncol. – 2011. – T. 6, № 1. – C. 8-14.

163. Kim, J.Y. Quercetin sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis via Sp1-mediated DR5 up-regulation and proteasome-mediated c-FLIPS down-regulation / J.Y. Kim, E.H. Kim, S.S. Park, J.H. Lim, T.K. Kwon, K.S. Choi // J Cell Biochem. – 2008. – T. 105, N_{0} 6. – C. 1386-98.

164. Yuan, H. Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells / H. Yuan, A. Gong, C.Y. Young // Carcinogenesis. – 2005. – T. 26, № 4. – C. 793-801.

165. Smale, S.T. Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID / S.T. Smale, M.C. Schmidt, A.J. Berk, D. Baltimore // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1990. – T. 87, № 12. – C. 4509-13.

166. Isalan, M. Selection of zinc fingers that bind single-stranded telomeric DNA in the G-quadruplex conformation / M. Isalan, S.D. Patel, S. Balasubramanian, Y. Choo // Biochemistry. -2001. - T. 40, No 3. - C. 830-6.

167. Piekna-Przybylska, D. U3 region in the HIV-1 genome adopts a G-quadruplex structure in its RNA and DNA sequence / D. Piekna-Przybylska, M.A. Sullivan, G. Sharma, R.A. Bambara // Biochemistry. – 2014. – T. 53, № 16. – C. 2581-93.

168. Sun, D. Evidence of the formation of G-quadruplex structures in the promoter region of the human vascular endothelial growth factor gene / D. Sun, K. Guo, Y.J. Shin // Nucleic Acids Res. -2011. - T. 39, No 4. - C. 1256-65.

169. Perrone, R. A dynamic G-quadruplex region regulates the HIV-1 long terminal repeat promoter / R. Perrone, M. Nadai, I. Frasson, J.A. Poe, E. Butovskaya, T.E. Smithgall, M. Palumbo, G. Palu, S.N. Richter // J Med Chem. – 2013. – T. 56, № 16. – C. 6521-30.

170. Todd, A.K. The relationship of potential G-quadruplex sequences in cis-upstream regions of the human genome to SP1-binding elements / A.K. Todd, S. Neidle // Nucleic Acids Res. -2008. - T. 36, No 8. - C. 2700-4.

171. Senger, D.R. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid / D.R. Senger, S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, H.F. Dvorak // Science. – 1983. – T. 219, № 4587. – C. 983-5.

172. Shih, T. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies / T. Shih, C. Lindley // Clin Ther. – 2006. – T. 28, № 11. – C. 1779-802.

173. Muhsin, M. Bevacizumab / M. Muhsin, J. Graham, P. Kirkpatrick // Nat Rev Drug Discov. – 2004. – T. 3, № 12. – C. 995-6.

174. Nonaka, Y. Screening and improvement of an anti-VEGF DNA aptamer /
Y. Nonaka, K. Sode, K. Ikebukuro // Molecules. – 2010. – T. 15, № 1. – C. 215-25.

175. Varey, A.H. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy / A.H. Varey, E.S. Rennel, Y. Qiu, H.S. Bevan, R.M. Perrin, S. Raffy, A.R. Dixon, C. Paraskeva, O. Zaccheo, A.B. Hassan, S.J. Harper, D.O. Bates // Br J Cancer. – 2008. – T. 98, № 8. – C. 1366-79.

176. Chen, Z. Roles of nucleolin. Focus on cancer and anti-cancer therapy / Z. Chen, X. Xu // Saudi Med J. – 2016. – T. 37, № 12. – C. 1312-1318.

177. Abdelmohsen, K. RNA-binding protein nucleolin in disease / K. Abdelmohsen, M. Gorospe // RNA Biol. – 2012. – T. 9, № 6. – C. 799-808.

178. Chen, J. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA / J. Chen, K. Guo, M.B. Kastan // J Biol Chem. – 2012. – T. 287, № 20. – C. 16467-76.

179. Fujiki, H. Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anticarcinogenic, and disease-related ligands / H. Fujiki, T. Watanabe, M. Suganuma // J Cancer Res Clin Oncol. – 2014. – T. 140, № 5. – C. 689-99.

180. Jain, N. Targeting nucleolin for better survival in diffuse large B-cell lymphoma / N. Jain, H. Zhu, T. Khashab, Q. Ye, B. George, R. Mathur, R.K. Singh, Z. Berkova, J.F. Wise, F.K. Braun, X. Wang, K. Patel, Z.Y. Xu-Monette, J. Courty, K.H. Young, L. Sehgal, F. Samaniego // Leukemia. – 2018. – T. 32, № 3. – C. 663-674.

181. Hovanessian, A. G. Surface expressed nucleolin is constantly induced in tumor cells to mediate calcium-dependent ligand internalization / A. G. Hovanessian, C. Soundaramourty, D. El Khoury, I. Nondier, J. Svab, B. Krust // PLoS One. – 2010. – T. 5, N_{2} 12. – C. e15787.

182. Hovanessian, A.G. The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton / A.G. Hovanessian, F. Puvion-Dutilleul, S. Nisole, J. Svab, E. Perret, J.S. Deng, B. Krust // Exp Cell Res. – 2000. – T. 261, № 2. – C. 312-28.

183. Koutsioumpa, M. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies /
M. Koutsioumpa, E. Papadimitriou // Recent Pat Anticancer Drug Discov. – 2014. – T. 9, №
2. – C. 137-52.

184. Tsou, J.H. Nucleolin regulates c-Jun/Sp1-dependent transcriptional activation of cPLA2alpha in phorbol ester-treated non-small cell lung cancer A549 cells / J.H. Tsou, K.Y. Chang, W.C. Wang, J.T. Tseng, W.C. Su, L.Y. Hung, W.C. Chang, B.K. Chen // Nucleic Acids Res. – 2008. – T. 36, № 1. – C. 217-27.

185. Wise, J.F. Nucleolin inhibits Fas ligand binding and suppresses Fas-mediated apoptosis in vivo via a surface nucleolin-Fas complex / J.F. Wise, Z. Berkova, R. Mathur, H. Zhu, F.K. Braun, R.H. Tao, A.L. Sabichi, X. Ao, H. Maeng, F. Samaniego // Blood. – 2013. – T. 121, № 23. – C. 4729-39.

186. Chen, X. Nucleolin-mediated cellular trafficking of DNA nanoparticle is lipid raft and microtubule dependent and can be modulated by glucocorticoid / X. Chen, S. Shank, P.B. Davis, A.G. Ziady // Mol Ther. – 2011. – T. 19, N_{2} 1. – C. 93-102.

187. Fujiwara, Y. Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear valosin-containing protein-like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal / Y. Fujiwara, K. Fujiwara, N. Goda, N. Iwaya, T. Tenno, M. Shirakawa, H. Hiroaki // J Biol Chem. – 2011. – T. 286, № 24. – C. 21732-41.

188. Tediose, T. Interplay between REST and nucleolin transcription factors: a key mechanism in the overexpression of genes upon increased phosphorylation / T. Tediose, M. Kolev, B. Sivasankar, P. Brennan, B.P. Morgan, R. Donev // Nucleic Acids Res. – 2010.
- T. 38, № 9. - C. 2799-812.

189. Wang, H.F. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with the Rho effector kinase ROCK2 / H.F. Wang, K. Takenaka, A. Nakanishi, Y. Miki // Cancer Res. – 2011. – T. 71, № 1. – C. 68-77.

190. Tate, A. Met-Independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells / S. Isotani, M.J. Bradley, R.A. Sikes, R. Davis, L.W. Chung, M. Edlund // BMC Cancer. – 2006. – T. 6. – C. 197.

191. Hanakahi, L.A. High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA / L.A. Hanakahi, H. Sun, N. Maizels // J Biol Chem. – 1999. – T. 274, № 22. – C. 15908-12.

192. Gomez-Outes, A. New parenteral anticoagulants in development / A. Gomez-Outes, M.L. Suarez-Gea, R. Lecumberri, E. Rocha, C. Pozo-Hernandez, E. Vargas-Castrillon // Ther Adv Cardiovasc Dis. – 2011. – T. 5, № 1. – C. 33-59.

193. Ireson, C.R. Discovery and development of anticancer aptamers / C.R. Ireson, L.R. Kelland // Mol Cancer Ther. – 2006. – T. 5, № 12. – C. 2957-62.

194. Rosenberg, J.E. A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma / J.E. Rosenberg, R.M. Bambury, E.M. Van Allen, H.A. Drabkin, P.N. Lara, Jr., A.L. Harzstark, N. Wagle, R.A. Figlin, G.W. Smith, L.A. Garraway, T. Choueiri, F. Erlandsson, D.A. Laber // Invest New Drugs. – 2014. – T. 32, N_{2} 1. – C. 178-87.

195. Soundararajan, S. Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 leukemia cells / S. Soundararajan, L. Wang, V. Sridharan,

W. Chen, N. Courtenay-Luck, D. Jones, E.K. Spicer, D.J. Fernandes // Mol Pharmacol. – 2009. – T. 76, № 5. – C. 984-91.

196. Wu, J. Nucleolin targeting AS1411 modified protein nanoparticle for antitumor drugs delivery / J. Wu, C. Song, C. Jiang, X. Shen, Q. Qiao, Y. Hu // Mol Pharm. – 2013. – T. 10, № 10. – C. 3555-63.

197. Bates, P.J. G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms / P.J. Bates, E.M. Reyes-Reyes, M.T. Malik, E.M. Murphy, M.G. O'Toole, J.O. Trent // Biochim Biophys Acta Gen Subj. – 2017. – T. 1861, № 5 Pt B. – C. 1414-1428.

198. Yazdian-Robati, R. Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review / R. Yazdian-Robati, P. Bayat, F. Oroojalian, M. Zargari, M. Ramezani, S.M. Taghdisi, K. Abnous // Int J Biol Macromol. – 2020. – T. 155. – C. 1420-1431.

199. Stow, J.L. Macropinocytosis: Insights from immunology and cancer / J.L. Stow, Y. Hung, A.A. Wall // Curr Opin Cell Biol. – 2020. – T. 65. – C. 131-140.

200. Girvan, A.C. AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin / A.C. Girvan, Y. Teng, L.K. Casson, S.D. Thomas, S. Juliger, M.W. Ball, J.B. Klein, W.M. Pierce, Jr., S.S. Barve, P.J. Bates // Mol Cancer Ther. – 2006. – T. 5, № 7. – C. 1790-9.

201. Soundararajan, S. The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells / S. Soundararajan, W. Chen, E.K. Spicer, N. Courtenay-Luck, D.J. Fernandes // Cancer Res. – 2008. – T. 68, № 7. – C. 2358-65.

202. Proietti, A.B. Assessment of fibrin(ogen) degradation products in preeclampsia using immunoblot, enzyme-linked immunosorbent assay, and latex-based agglutination / A.B. Proietti, M.J. Johnson, F.A. Proietti, J.T. Repke, W.R. Bell // Obstet Gynecol. – 1991. – T. 77, № 5. – C. 696-700.

203. (NCT00881244, Study of AS1411 in Advanced Solid Tumours)204. NCT00740441 [A phase II Study of AS1411 in Renal Cell Carcinoma]

205. (NCT00512083) [Phase II Study of AS1411 Combined with Cytarabine to Treat Acute Myeloid Leukemia]

206. NCT01034410

207. Shao, X. Placental trophoblast syncytialization potentiates macropinocytosis via mTOR signaling to adapt to reduced amino acid supply / X. Shao, G. Cao, D. Chen, J. Liu, B. Yu, M. Liu, Y.X. Li, B. Cao, Y. Sadovsky, Y.L. Wang // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2021. – T. 118, № 3.

208. Bishop, G.R. Characterization of DNA structures by circular dichroism / G.R. Bishop, J.B. Chaires // Curr Protoc Nucleic Acid Chem. – 2003. – T. Chapter 7. – C. Unit 7 11.

209. Huppert, J.L. Prevalence of quadruplexes in the human genome / J.L. Huppert,
S. Balasubramanian // Nucleic Acids Res. - 2005. - T. 33, № 9. - C. 2908-16.

210. Todd, A.K. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA / A.K. Todd, M. Johnston, S. Neidle // Nucleic Acids Res. – 2005. – T. 33, № 9. – C. 2901-7.

211. Scaria, V. Quadfinder: server for identification and analysis of quadruplexforming motifs in nucleotide sequences / V. Scaria, M. Hariharan, A. Arora, S. Maiti // Nucleic Acids Res. – 2006. – T. 34, № Web Server issue. – C. W683-5.

212. Kikin, O. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences / O. Kikin, L. D'Antonio, P.S. Bagga // Nucleic Acids Res. – 2006. – T. 34, № Web Server issue. – C. W676-82.

213. Kudlicki, A.S. G-Quadruplexes Involving Both Strands of Genomic DNA Are Highly Abundant and Colocalize with Functional Sites in the Human Genome / A.S. Kudlicki // PLoS One. – 2016. – T. 11, № 1. – C. e0146174.

214. Dhapola, P. QuadBase2: web server for multiplexed guanine quadruplex mining and visualization / P. Dhapola, S. Chowdhury // Nucleic Acids Res. – 2016. – T. 44, № W1. – C. W277-83.

215. Bedrat, A. Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter / A. Bedrat,
L. Lacroix, J.L. Mergny // Nucleic Acids Res. – 2016. – T. 44, № 4. – C. 1746-59.

216. Sahakyan, A.B. Machine learning model for sequence-driven DNA Gquadruplex formation / A.B. Sahakyan, V.S. Chambers, G. Marsico, T. Santner, M. Di Antonio, S. Balasubramanian // Sci Rep. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 14535.

217. Hon, J. pqsfinder: an exhaustive and imperfection-tolerant search tool for potential quadruplex-forming sequences in R / J. Hon, T. Martinek, J. Zendulka, M. Lexa // Bioinformatics. -2017. - T. 33, No 21. -C. 3373-3379.

218. Varizhuk, A. The expanding repertoire of G4 DNA structures / A. Varizhuk, D.
Ischenko, V. Tsvetkov, R. Novikov, N. Kulemin, D. Kaluzhny, M. Vlasenok, V. Naumov,
I. Smirnov, G. Pozmogova // Biochimie. – 2017. – T. 135. – C. 54-62.

219. Garant, J.M. Motif independent identification of potential RNA G-quadruplexes
by G4RNA screener / J.M. Garant, J.P. Perreault, M.S. Scott // Bioinformatics. – 2017. – T.
33, № 22. – C. 3532-3537.

220. Di Salvo, M. G4PromFinder: an algorithm for predicting transcription promoters in GC-rich bacterial genomes based on AT-rich elements and G-quadruplex motifs / M. Di Salvo, E. Pinatel, A. Tala, M. Fondi, C. Peano, P. Alifano // BMC Bioinformatics. – 2018. – T. 19, № 1. – C. 36.

221. Dolinnaya, N.G. Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer / N.G. Dolinnaya, A.V. Yuminova, V.A. Spiridonova, A.M. Arutyunyan, A.M. Kopylov // J Biomol Struct Dyn. – 2012. – T. 30, N_{2} 5. – C. 524-31.

222. Vinores, S.A. Technology evaluation: pegaptanib, Eyetech/Pfizer / S.A. Vinores // Curr Opin Mol Ther. – 2003. – T. 5, № 6. – C. 673-9.

223. Ng, E.W. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease / E.W. Hg, D.T. Shima, P. Calias, E.T. Cunningham, Jr., D.R. Guyer, A.P. Adamis // Nat Rev Drug Discov. – 2006. – T. 5, № 2. – C. 123-32.

224. Lau, Y.K. Targeting STAT3 in Cancer with Nucleotide Therapeutics / Y.K. Lau, M. Ramaiyer, D.E. Johnson, J.R. Grandis // Cancers (Basel). – 2019. – T. 11, № 11.

225. Bates, P.J. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding / P.J. Bates, J.B. Kahlon, S.D. Thomas, J.O. Trent, D.M. Miller // J Biol Chem. – 1999. – T. 274, № 37. – C. 26369-77.

226. Lang, F. Mechanisms and significance of cell volume regulation / F. Lang // J Am Coll Nutr. – 2007. – T. 26, № 5 Suppl. – C. 613S-623S.

227. Bidzinska, J. G-quadruplex structures in the human genome as novel therapeutic targets / J. Bidzinska, G. Cimino-Reale, N. Zaffaroni, M. Folini // Molecules. – 2013. – T. 18, № 10. – C. 12368-95.

228. Kwok, C.K. Structural Analysis using SHALiPE to Reveal RNA G-Quadruplex Formation in Human Precursor MicroRNA / C.K. Kwok, A.B. Sahakyan, S. Balasubramanian // Angew Chem Int Ed Engl. – 2016. – T. 55, № 31. – C. 8958-61.

229. Brazda, V. DNA and RNA quadruplex-binding proteins / V. Brazda, L. Haronikova, J.C. Liao, M. Fojta // Int J Mol Sci. – 2014. – T. 15, № 10. – C. 17493-517.

230. Sissi, C. The evolving world of protein-G-quadruplex recognition: a medicinal chemist's perspective / C. Sissi, B. Gatto, M. Palumbo // Biochimie. – 2011. – T. 93, № 8. – C. 1219-30.

231. Belmonte-Reche, E. G4-iM Grinder: when size and frequency matter. G-Quadruplex, i-Motif and higher order structure search and analysis tool / E. Belmonte-Reche, J.C. Morales // NAR Genom Bioinform. – 2020. – T. 2, N_{2} 1. – C. lqz005.

232. Ahmad, K.M. Selection is more intelligent than design: improving the affinity of a bivalent ligand through directed evolution / K.M. Ahmad, Y. Xiao, H.T. Soh // Nucleic Acids Res. – 2012. – T. 40, № 22. – C. 11777-83.

233. Jing, N. Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides in Vitro / N. Jing, C. Marchand, J. Liu, R. Mitra, M.E. Hogan, Y. Pommier // J Biol Chem. – 2000. – T. 275, № 28. – C. 21460-7.

234. Jing, N. Structure-activity of tetrad-forming oligonucleotides as a potent anti-HIV therapeutic drug / N. Jing, M.E. Hogan // J Biol Chem. – 1998. – T. 273, № 52. – C. 34992-9.

235. Virgilio, A. Monomolecular G-quadruplex structures with inversion of polarity sites: new topologies and potentiality / A. Virgilio, A. Russo, T. Amato, G. Russo, L. Mayol, V. Esposito, A. Galeone // Nucleic Acids Res. – 2017. – T. 45, № 14. – C. 8156-8166.

236. Kelley, S. I. HIV-integrase aptamer folds into a parallel quadruplex: a thermodynamic study / S. Kelley, S. Boroda, K. Musier-Forsyth, B. Kankia // Biophys Chem. – 2011. – T. 155, № 2-3. – C. 82-8.

237. Esposito, V. Exploring the binding of d(GGGT)4 to the HIV-1 integrase: An approach to investigate G-quadruplex aptamer/target protein interactions / V. Esposito, L. Pirone, L. Mayol, E. Pedone, A. Virgilio, A. Galeone // Biochimie. – 2016. – T. 127. – C. 19-22.

238. Hazel, P. Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes / P. Hazel, J. Huppert, S. Balasubramanian, S. Neidle. // J Am Chem Soc. – 2004. – T. 126, № 50. – C. 16405-15.

239. Smargiasso, N. G-quadruplex DNA assemblies: loop length, cation identity, and multimer formation / N. Smargiasso, F. Rosu, W. Hsia, P. Colson, E.S. Baker, M.T. Bowers, E. De Pauw, V. Gabelica // J Am Chem Soc. – 2008. – T. 130, № 31. – C. 10208-16.

240. Bates, P.J. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer / P.J. Bates, D.A. Laber, D.M. Miller, S.D. Thomas, J.O. Trent // Exp Mol Pathol. – 2009. – T. 86, № 3. – C. 151-64.

241. Xu, X. Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides / X. Xu, F. Hamhouyia, S.D. Thomas, T.J. Burke, A.C. Girvan, W.G. McGregor, J.O. Trent, D.M. Miller, P.J. Bates // J Biol Chem. – 2001. – T. 276, № 46. – C. 43221-30.

242. Ogloblina, A.M. Multi-targeted effects of G4-aptamers and their antiproliferative activity against cancer cells / A.M. Ogloblina, A.N. Khristich, N.Y. Karpechenko, S.E.

Semina, G.A. Belitsky, N.G. Dolinnaya, M.G. Yakubovskaya // Biochimie. – 2018. – T. 145. – C. 163-173.

243. Muench, D. Quadruplex-forming oligonucleotide targeted to the VEGF promoter inhibits growth of non-small cell lung cancer cells / D. Muench, F. Rezzoug, S.D. Thomas, J. Xiao, A. Islam, D.M. Miller, K.C. Sedoris // PLoS One. – 2019. – T. 14, № 1. – C. e0211046.

244. Chhabra, G. Mechanism of Action of G-Quadruplex-Forming Oligonucleotide Homologous to the Telomere Overhang in Melanoma / G. Chhabra, L. Wojdyla, M. Frakes, Z. Schrank, B. Leviskas, M. Ivancich, P. Vinay, R. Ganapathy, B.E. Ramirez, N. Puri // J Invest Dermatol. – 2018. – T. 138, № 4. – C. 903-910.

245. Bharti, A.K. Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I / A.K. Bharti, M.O. Olson, D.W. Kufe, E.H. Rubin // J Biol Chem. – 1996. – T. 271, № 4. – C. 1993-7.

246. Huang, C. Crosstalk of Sp1 and STAT3 signaling in pancreatic cancer pathogenesis / C. Huang, K. Xie // Cytokine Growth Factor Rev. – 2012. – T. 23, № 1-2. – C. 25-35.

247. Pommier, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges / Y. Pommier // ACS Chem Biol. – 2013. – T. 8, № 1. – C. 82-95.

248. Magbanua, E. (GGGT) 4 and r(GGGU) 4 are both HIV-1 inhibitors and interleukin-6 receptor aptamers / E. Magbanua, T. Zivkovic, B. Hansen, N. Beschorner, C. Meyer, I. Lorenzen, J. Grotzinger, J. Hauber, A.E. Torda, G. Mayer, S. Rose-John, U. Hahn // RNA Biol. – 2013. – T. 10, N_{2} 2. – C. 216-27.

249. Pavlova, A.V., Responses of DNA Mismatch Repair Proteins to a Stable G-Quadruplex Embedded into a DNA Duplex Structure / A.V. Pavlova, M.V. Monakhova, A.M. Ogloblina, N.A. Andreeva, G.Y. Laptev, V.I. Polshakov,N.G. Dolinnaya // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — № 21(22). — C. 8773-8799

250. Ogloblina, A.M. Toward G-Quadruplex-Based Anticancer Agents: Biophysical and Biological Studies of Novel AS1411 Derivatives. / A.M. Ogloblina, N. Iaccarino, D.

Capasso, S. Di Gaetano, E.U. Garzarella, N.G. Dolinnaya, A. Randazzo // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — №21(20). — C. 7781-7803

251. Долинная, Н.Г. G-квадруплексы ДНК и онкологические заболевания / Н.Г. Долинная, А.М. Оглоблина, Н.Ю. Карпеченко, М.Г. Якубовская // Успехи молекулярной онкологии. — 2016. — № 4. – С.4

252. Dolinnaya, N.G. Structure, properties, and biological relevance of the DNA and RNA G-quadruplexes: Overview 50 years after their discovery. / N.G. Dolinnaya, A.M. Ogloblina, M.G. Yakubovskaya // Biochemistry (Moscow). — 2016. — №13. — C.1602-1649

253. Pandey, S. Transcription blockage by stable H-DNA analogs in vitro / S. Pandey, A.M. Ogloblina, B.P. Belotserkovskii, N.G. Dolinnaya, M.G. Yakubovskaya, S.M. Mirkin, P.C. Hanawalt // Nucleic Acids Research. — 2015. — №14. — C.6994-7004

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1 - Гены, содержащие G4-мотив 3131313 в промоторной области

Последовательность	Ген
GGGAGGGAGGGAGGGAGGG	ABR
GGGAGGGAGGGAGGGTGCTGGGGGG	AGPAT1
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGG	AIF1L
GGGAGGGAGGGAGGGAAGGAGGG	ССК
GGGAGGGAGGGAGGGAGGG	CCL26
GGGAGGGAGGGAGGGAAGGAGGG	CLMP
GGGAGGGAGGGAGGGAGGG	DENR
GGGAGGGAGGGAGGGCGCGCGGG	DNMT3A
GGGAGGGAGGGAGGGTGGGCGAGGGG	ELAVL3
GGGAGGGAGGGAGGGAGGAGGGG	ELOVL4
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGG	FOXF2
GGGAGGGAGGGAGGGAGGAGGAAGGG	GATA1
GGGAGGGAGGGAGGGAGGG	GPR113
GGGAGGGAGGGAGGGAGGCTCAGGG	GPR146
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGAGGGG	MYOZ3
GGGAGGGAGGGAGGGAGTGGAGGG	NYAP2
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGAAGGAGGG	PARD3
GGGAGGGAGGGAGGGAATGAGGG	PDE1C
GGGAGGGAGGGAGGGAATGAGGG	PDE1C
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGATGAGGG	PRAMEF21
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGG	RASGRF1
GGGAGGGAGGGAGGGAGCAAGGGG	SCN9A
GGGAGGGAGGGAGGGAAGGAAGGG	SIGLEC15
GGGAGGGAGGGAGGGGGGGGG	SLC1A4

GGGAGGGAGGGAGGGAGGCAGCGGG	WDR72
GGGCGGGAGGGAGGGTGGGGAAAGGGGG	APBA1
GGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	ITGA7
GGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	MEX3B
GGGCGGGCGGGAGGGCTGGCGGG	SYT7
GGGTGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	ZBTB18
GGGAGGGTGGGAGGGAGAGAGAGGG	TBX5
GGGCGGGTGGGAGGGAAGGTCGGG	UCK2
GGGAGGGAGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	ATXN1
GGGCGGGCGGGCGGGGCGCGGGG	AMDHD2
GGGCGGGCGGGCGGGGCCGGGG	ATAD3A
GGGCGGGCGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CACNA1C
GGGCGGGCGGGCGGGCGGGCAGGCTGGG	CCDC117
GGGCGGGCGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CEP170B
GGGCGGGCGGGCGGGCGAAGCTGGG	HRASLS
GGGCGGGCGGGCGGGTGCGGCCGGG	LTBP4
GGGCGGGCGGGCGGGGGGG	MKI67
GGGCGGGCGGGCGGGGGGGCTGGG	PHF11
GGGCGGGCGGGCGGGCAGCCCGGG	PIGQ
GGGCGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	UBTF
GGGCGGGTGGGCGGGCGAGCGGG	GAB1
GGGTGGGTGGGTGGGTGGGGAGGAGGG	NTRK3
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGGAGGGG	ANKRD17
GGGAGGGAGGGAGGGAAGAAGGG	TRIM9
GGGAGGGAGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	ARID1A
GGGCGGGAGGGTGGGAGGG	ATP1A1
GGGAGGGAGGGAGGGACACAGGG	ATP2B2

GGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGGG	B3GNT8
GGGCGGGCGGGCGGGCGGCGGGGGG	BAI2
GGGAGGGCGGGCGGGGGGG	C11orf96
GGGAGGGAGGGAGGGGGGGGGGG	CALHM1
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CAST
GGGAGGGAGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CCDC136
GGGCGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CHRNA3
GGGAGGGCGGGAGGGGGGGGAGAGAGGG	CTDSPL
GGGCGGGAGGGCGGGAGGGCGGG	CTDSPL
GGGCGGGCGGGCGGGGGGGG	CXCL12
GGGCGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	DCAKD
GGGAGGGAGGGAGGGACGGCGGGGG	DCTD
GGGCGGGCGGGCGGGGGGGG	DLGAP4
GGGCGGGCGGGAGGGGGGGGGGG	DOT1L
GGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	DPYSL4
GGGCGGGCGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	ELN
GGGAGGGCGGGAGGGCGGG	ENOSF1
GGGTGGGTGGGTGGGGGG	ESRRG
GGGAGGGAGGGAGGGAAGGAGGG	GNA13
GGGCGGGCGGGAGGGAGGG	JMJD8
GGGAGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGG	KANSL1
GGGAGGGAGGGAGGGAGTGAGGGGG	KCNC1
GGGCGGGAGGGAGGAGGAGGTGGGG	KIAA0247
GGGAGGGAGGGAGGGAGGG	KLHL1
GGGAGGGAGGGAGGAGCACGGG	LDB2
GGGTGGGCGGGTGGGTGGG	LGI1
GGGCGGGCGGGTGGGCGTCGGG	MAPK8IP2

GGGAGGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	MAZ
GGGTGGGTGGGTGGGCGTAGCCGGGG	MMGT1
GGGCGGGCGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	MPRIP
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGG	MTRF1
GGGAGGGAGGGCGGGGGGG	MTUS2
GGGAGGGAGGGAGGGATCACCGGG	ONECUT2
GGGAGGGCGGGAGGGCAGGAGGG	PABPC1L2B
GGGAGGGAGGGAGGGAGCCAGGGG	PAWR
GGGAGGGAGGGAGGGGGGG	PAX2
GGGCGGGCGGGTGGGCGAGGG	PCBP1
GGGAGGGAGGGGGGGGAGAGCCGGG	PHF13
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGTCCCGGG	PLCXD1
GGGAGGGAGGGAGGGGGGG	SIN3A
GGGCGGGCGGGCGGGCGGGCATGGG	SLC6A8
GGGAGGGAGGGAGGGGGGG	SNX16
GGGAGGGAGGGCGGGCGGCTGGG	SOCS7
GGGAGGGAGGGAGGGGGG	SQSTM1
GGGAGGGAGGGAGGGAAGGAAGGGG	SSFA2
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGCGGG	SYT10
GGGAGGGAGGGCGGGGGGG	TMEM163
GGGAGGGAGGGAGGGAGAGAGGG	UBE2R2
GGGCGGGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	WNT4
GGGAGGGAGGGCGGGAAGTGGGGG	WT1
GGGCGGGCGGGCGGGCTAGCGCCGGG	XPNPEP1
GGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGACGGG	ZNF641