

ОГЛОБЛИНА АННА МАКСИМОВНА

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Якубовская Марианна Геннадиевна

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Спиридонова Вера Алексеевна, доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник отдела хроматографического анализа научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации.

Защита состоится «30» июня 2022 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д 001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «15» апреля 2022 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы 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, происходящие на уровне эпигенетической регуляции экспрессии генов, в том числе, влияющие на формирование альтернативных структур ДНК. 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 различных организмов и, в том числе, человека. По разным оценкам, в зависимости от алгоритма биоинформатического анализа, геном человека содержит от 375 000 до 560 000 G4-мотивов. При этом локализация G4-мотивов 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 G4-мотивами. Было продемонстрировано, что формирование G4 в промоторах ряда онкогенов, способно существенно подавлять их экспрессию.

Регуляторная функция G4 осуществляется благодаря способности G4-мотивов в определенных условиях переходить из классической В-формы ДНК в форму G4. Известен целый ряд внутриклеточных белков и низкомолекулярных соединений, проявляющих повышенное сродство либо к G4-мотивам, либо к сформированной структуре G4. Таким образом, стабилизация и дестабилизация G4 специфическими низкомолекулярными лигандами и G4-распознающими белками способна вносить изменения в профиль экспрессии генов, регулируя участие G4-мотивов в различных динамических процессах, которые и определяют 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, в том числе и экзогенными, может влиять на такие клеточные процессы как транскрипция (SP1, NMP1), трансляция (FXR1P, Pat1, hnRNP A), репликация (RecQ, Pif1), рекомбинации (RecA), передача сигнала о повреждении ДНК (PARP1). Учитывая высокий уровень активности перечисленных процессов в опухолевой клетке, а также их прямое влияние на пролиферацию и выживаемость опухолевой клетки, экзогенные гуанинбогатые олигонуклеотиды, способные формировать G4 (G4-аптамеры) и связываться с белками, стимулирующими процессы деления клетки, рассматриваются в настоящее время как потенциальные противоопухолевые агенты.

Попадая в клетку, G4-аптамеры связываются с соответствующими ферментами и ингибируют их активность. В модельных системах *in vitro* было продемонстрировано, 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 G4-аптамеры 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 G4-распознающими белками. Однако плеiotропность 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 плеiotропности 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*.

Функциональная роль G4 в регуляции многих клеточных процессов подтверждена наличием у широкого ряда белков способности связывать данные неканонические структуры. На данный момент известно более шестидесяти 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 рассматривают G4-аптамеры – олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью связывать целевой белок. 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 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 G4-аптамеров, распознаваемых «целевыми» белками противоопухолевой терапии.
3. Провести анализ плеiotропности действия ряда G4-аптамеров, разработанных с целью специфического ингибирования таргетных белков противоопухолевой терапии (STAT3 и TOP1).
4. Сравнить эффект отобранных G4-аптамеров на процесс репликации и жизнеспособность опухолевой (MCF-7) и условно-нормальной (MCF-10A) линий клеток молочной железы.
5. Провести анализ зависимостей биологических эффектов G-аптамеров от их структуры и физико-химических характеристик.

Методология и методы исследования

В работе использовали комплексный анализ с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов. 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 использованием люциферазных репортерных конструкций. Биоинформатический анализ проводили методами компьютерного анализа баз данных генома человека (human genome GRCh37/hg19). Полученные данные рассчитывали как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмагорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistical10 (StatSoft, США). Были использованы t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Научная новизна

В представленной работе впервые показано, что один и тот же G4-мотив может предшествовать более чем двадцати различными генам, что открывает возможность кластерной регуляции экспрессии генов благодаря формированию G4.

На моделях *in vitro* опухоли молочной железы (линии опухолевых клеток MCF-7) и условно нормальной ткани молочной железы (линии immortalized клеток MCF-10A) продемонстрирована избирательность цитотоксического эффекта ряда G4-аптамеров в отношении опухолевых клеток.

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

Впервые установлен плеiotропный эффект G4-аптамеров – доказано, что они способны связываться 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 с белком, к которому он был разработан, но и с белками, обладающими сродством к структурам такого типа. До этого эффекты G4-аптамеров, 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 о механизмах влияния G4-аптамеров 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. Клинические исследования показывают, что высокоселективное ингибирование лишь одного из сигнальных путей в опухолевой клетке, как правило, приводит к ограниченному ответу. Для таргетной терапии существенной проблемой является быстрое приобретение опухолевыми клетками резистентности. Считается, что развитие резистентности обусловлено пролиферацией клона клеток, несущих мутации, отменяющие действие таргетного препарата. В связи с этим, новым объектом современных 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-мотивов и G4-распознающих белков. Таким образом, практическое значение данного исследования связано с потенциальным использованием G-богатых олигонуклеотидов в качестве агентов мультитаргетной терапии.

Личный вклад

В диссертационной работе обсуждены и обобщены результаты, полученные лично автором или в соавторстве. Автору принадлежит основная роль на всех этапах работы: от выбора направления и объектов исследования, постановки задачи, планирования, разработки и обоснования путей решения, проверки предложенных в работе экспериментальных подходов, проведении исследования,

до обсуждения и оформления полученных результатов. Лично автором или при активном участии автора была проведена подготовка всех публикаций по выполненной диссертационной работе.

Соответствие паспорту специальности

Диссертационная работа, выполненная Оглоблиной Анной Максимовной, соответствуют специальности 3.1.6. Онкология, лучевая диагностика («Биологические науки»).

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).
2. Методами УФ-плавления и кругового дихроизма доказано формирование G4 олигонуклеотидами, разработанными в качестве ингибиторов ряда 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 плеiotропности 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 MCF-7 в сравнении с иммортализованными клетками нормальной ткани молочной железы линии MCF-10A.
5. Анализ физико-химических характеристик биологически активных G4-аптамеров свидетельствует о преимущественном формировании ими параллельных G-квадруплексов.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в научно-практическую деятельность отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Основные положения диссертационной работы обсуждены на следующих научно-практических мероприятиях: конференция работ молодых ученых «Ломоносов 2013» (8-12 апреля 2013, Москва, Россия), 58-я 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). Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции с участием: отдела химического канцерогенеза, отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, состоявшейся 22 сентября 2021 года.

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в полном объеме в 9 научных публикациях, из них 6 статей, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Объём и структура работы

Диссертация построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты собственных экспериментов и их обсуждение, заключения и выводы. Работа изложена на 139 страницах, включает 14 таблиц, 28 рисунков и 253 ссылки на источники литературы, включая публикации последних лет, а также одно приложение.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследованы физико-химические и молекулярно-биологические свойства 12 олигонуклеотидов. Был проведен поиск среди опубликованных научных данных последовательностей G4-аптамеров, разработанных к таргетным белкам противоопухолевой терапии. В исследование были включены те G4-аптамеры, белки-мишени которых рассматриваются как потенциальные мишени таргетной терапии, 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, концентрация полумаксимального ингибирования IC₅₀, константа связывания с целевым белком, а также ссылка на соответствующие исследования указаны в таблице 1. Олигонуклеотид Масиген является ДНК-аналогом аптамера к VEGF-A. Данный олигонуклеотид был использован в качестве отрицательного контроля как последовательность, обладающая биологической активностью (подавление активности VEGF-A), но не способная формировать G4.

Кроме того, в работе использовались симметричные G4-образующие олигонуклеотиды. Они были включены в исследование, чтобы продемонстрировать, что олигонуклеотид, способный формировать G4, потенциально способен связываться с G4-связывающими белками и влиять на их активность. Также в исследование была включена модификация G4-аптамера AS1411. Для повышения стабильности в каждом тракте последовательности аптамера AS1411 количество гуанинов было увеличено с двух до трех единиц. Олигонуклеотид случайной последовательности был использован в качестве контроля. Таким образом в исследование были включены 12 олигонуклеотидов (Таблица 1).

Таблица 1 - G4-аптамеры, использованные в исследовании

I. Опубликованные ранее разработанные для таргетной терапии G4-аптамеры				
Название	Белок-мишень	Последовательность	IC₅₀, нМ	КК_d, нМ
G4-TOP1	TOP1	GACTACGGGTTGGTGTGGTTGGGTAGTCTT	280	-
G4-SP1	SP-1	GGCGAGGAGGGGCGTGGCCGG	-	1,3
G4-VEGF	VEGF	TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTAGA	-	1,1
Macugen	VEGF	CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCG	2,5	4,9
G4-STAT3	STAT3	GGGTGGGTGGGTGGGT	10000	-
G4-NCL	Нуклеолин	CCCCCGGGGCGGGCCGGGGGCGGGGTCCCGG CGGGGCGGAGCCATG	-	79
As1411	Нуклеолин	GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG	-	25
G4-SHP2	SHP2	GCGTCGAATACCACTACAGGGGGTTTTGGTGG GGGGGGCTGGGTTGTCTTGGGGGTGGGCTAAT GGAGCTCGTGGTCAT	29	11
II. Олигонуклеотиды, разработанные для исследования с целью усовершенствования характеристик известных G4-аптамеров				
Название	Последовательность			
G4-TGT	GGGTGGGTGTGGGTGGG			
G4-CCC	GGGTGGGCCCCGGGTGGG			
As-GGG	GGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGTGGGTTGGGTTGGGTTGGG			
Random	CGATGCGTAGCTGAAGCTGCTGCAG			

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.

Способность выбранных G4-олигонуклеотидов подавлять функционирование TOP1 определяли при помощи стандартного теста на активность данного фермента – способности TOP1 релаксировать сверхспирализованную плазмиду pUC19 в зависимости от концентрации олигонуклеотида.

Также было определено влияние G4-олигонуклеотидов на активность транскрипционного фактора STAT3. Для этого в геном клетки MCF-7 была введена репортерная конструкция, несущая ген люциферазы светляка (firefly luciferase gene) под контролем STAT3-респонсивных элементов. Таким образом интенсивность синтеза люциферазы напрямую зависела от транскрипционной активности STAT3. Так как транскрипционная активность STAT3 запускается под воздействием определенных сигналов, его активацию инициировали добавлением в клеточную среду экзогенного человеческого интерлейкина-6 (25 нг/мл), а затем оценивали активность STAT3 при воздействии G4-аптамеров в разных концентрациях.

Цитостатические эффекты G4-аптамеров были оценены 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 было проведено сопоставление полученных закономерностей с целью подтверждения/опровержения существования плеiotропного эффекта G4-аптамеров.

Результаты исследования

Конформационный анализ G4-аптамеров методом кругового дихроизма

Была изучена способность каждого из выбранных олигонуклеотидов формировать G4, а также конформация сформированных структур методом кругового дихроизма в двух буферах: буферном растворе A-K⁺ и буферном растворе A-Li⁺ (Рисунок 1 и Рисунок 2). Буферный раствор A-K⁺ был подобран

таким образом, чтобы концентрации одновалентных металлов (K^+ и Na^+), ионная сила и значение pH соответствовали средним значениям внутриклеточной среды эукариотических клеток (кривые обозначены на графиках непрерывной линией). В буферном растворе A- Li^+ ионы K^+ и Na^+ были заменены ионами Li^+ . Таким образом, в буферном растворе A- Li^+ отсутствовали компоненты, способствующие формированию G4 (пунктирные кривые на графиках).

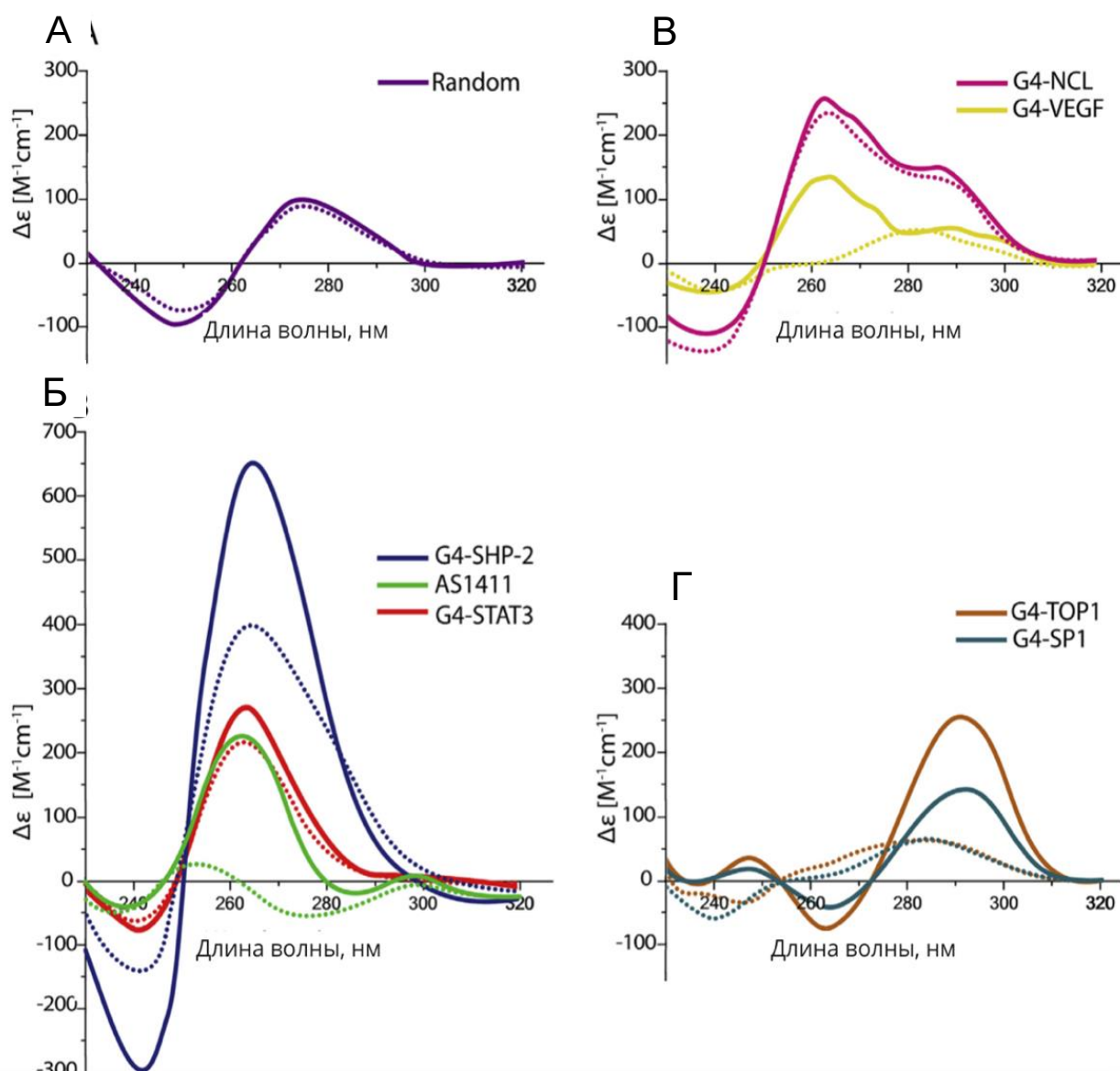


Рисунок 1 – Графики спектров кругового дихроизма исследуемых олигонуклеотидов в буферном растворе A (K^+) и A- Li^+ , 37°C: (A) Random; (Б) G4-NCL и G4-VEGF; (Б) G4-STAT3, G4-SHP2, AS1411; (Г) G4-TOP1, G4-SP1

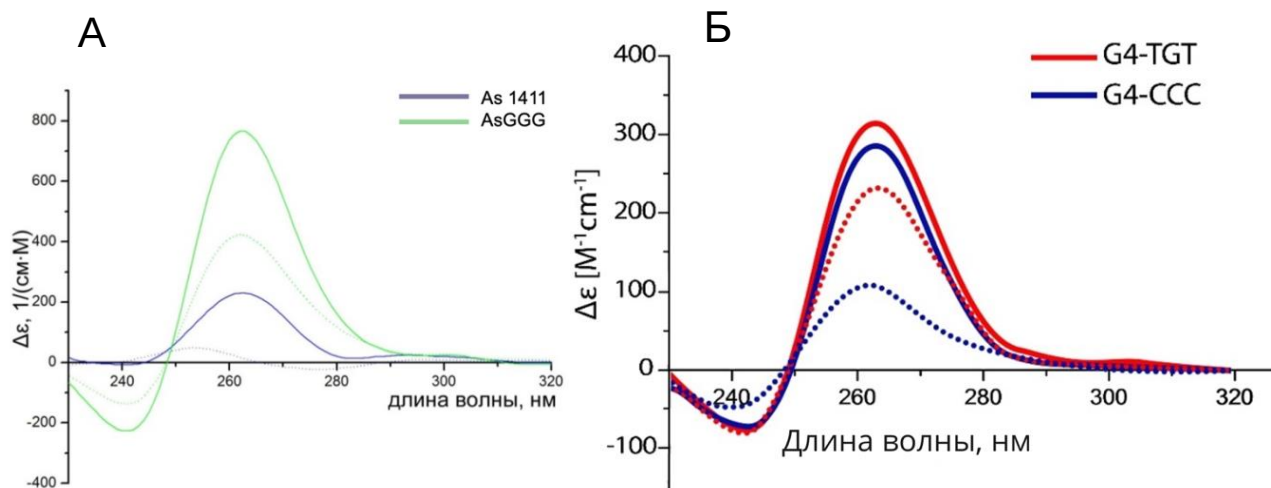


Рисунок 2 – Графики спектров кругового дихроизма олигонуклеотидов As 1411 и его модифицированного аналога AsGGG в буфере А (K⁺) и А-Li⁺, 37°C (А), G4-TGT и G4-CCC (Б)

Большинство из полученных спектров кругового дихроизма свидетельствуют о формировании изучаемыми последовательностями ДНК G4. Исключение составили олигонуклеотиды Mascigen и Random, последовательности которых заведомо не позволяют им формировать G4. Спектры кругового дихроизма, полученные для данных олигонуклеотидов (Рисунок 1 А), представляют собой типичный вид спектров неструктурированных олигонуклеотидов, имеющих небольшой максимальный экстремум при 275 нм и минимальный экстремум при 250 нм.

Симметричные олигонуклеотиды G4-TGT и G4-CCC формируют параллельные структуры G4, что согласуется с современными представлениями о влиянии последовательности G4-мотива на формируемую структуру. Олигонуклеотиды G4-STAT3, G4-SHP2, AS1411 и AsGGG также формируют G4 параллельного типа. Все они имеют в составе однонуклеотидные петли, которые не допускают конформационного разнообразия структуры G4. 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. Тип структуры G4, формируемых изученными G4-аптамерами представлен в таблице 2.

Влияние G4-аптамеров на транскрипционную активность STAT3

G4-аптамеры были протестированы на способность ингибировать активность STAT3 в клеточной линии аденокарциномы молочной железы MCF-7. G-богатые олигонуклеотиды добавляли к клеткам в трех концентрациях (10, 50 и 150 μM) и инкубировали на протяжении суток. 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 2.

Аптамер, разработанный для ингибирования STAT3 – G4-STAT3 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 (Рисунок 3).

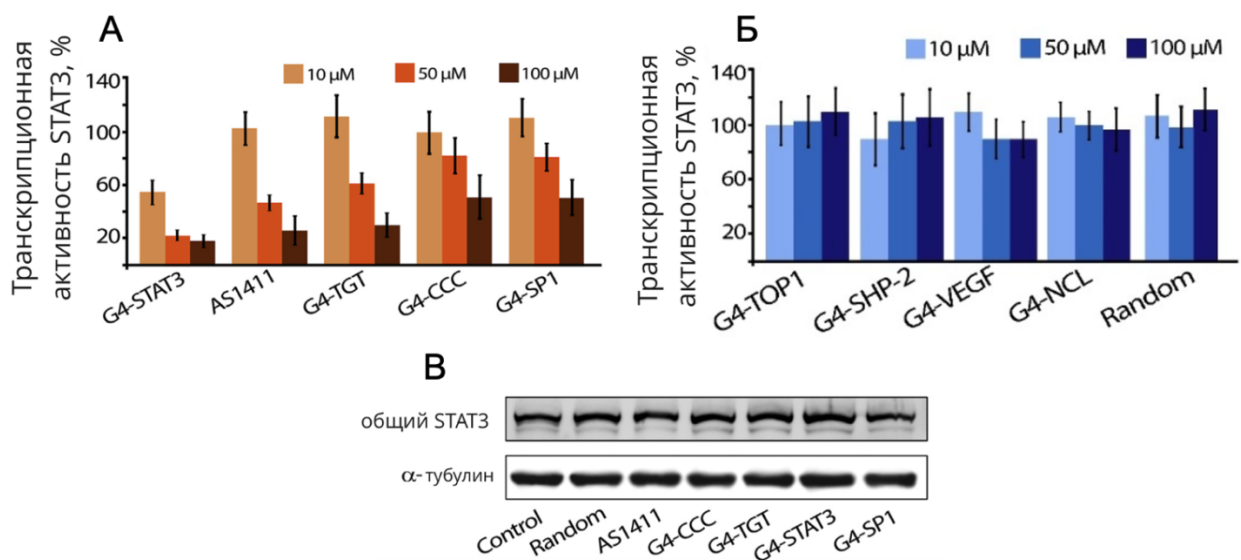


Рисунок 3 - Влияние G4-аптамеров на транскрипционную активность STAT3 (А), Отсутствие влияние длинных G-богатых олигонуклеотидов на транскрипционную активность STAT3 (Б), Отсутствие прямого влияния G4-аптамеров на экспрессию STAT3 ($M \pm SD$)

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. G4, сформированные данными олигонуклеотидами, обладали параллельной ориентацией цепей ДНК в квадруплексном коре. Все олигонуклеотиды проявили ингибирующую активность в микромолярных концентрациях (Таблица 2). Наилучшим ингибитором транскрипционной активности STAT3 является олигонуклеотид G4-STAT3, $IC_{50}=15\pm3$ μ M. Самым слабым ингибирующим действием из группы обладал олигонуклеотид G4-SP1, $IC_{50}=140\pm30$ μ M.

Влияние G4-аптамеров на активность TOP1

Ингибирующая способность набора G4-олигонуклеотидов в отношении TOP1 была определена при помощи анализа электрофореграмм продуктов релаксации сверхспирализованной плазмиды pUC19 под действием фермента. Метод определения активности TOP1 основан на различной 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 агарозном геле. TOP1 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 4. Интенсивность сигнала сверхспирализованной ДНК (зеленая стрелка) растет с увеличением концентрации олигонуклеотидов в реакционной смеси, в то время как доля

релаксированной формы плазмиды снижается. Степень ингибирования фермента определялась как отношение количества сверхспирализованной формы плазмидной ДНК к суммарному количеству плазмидной ДНК.

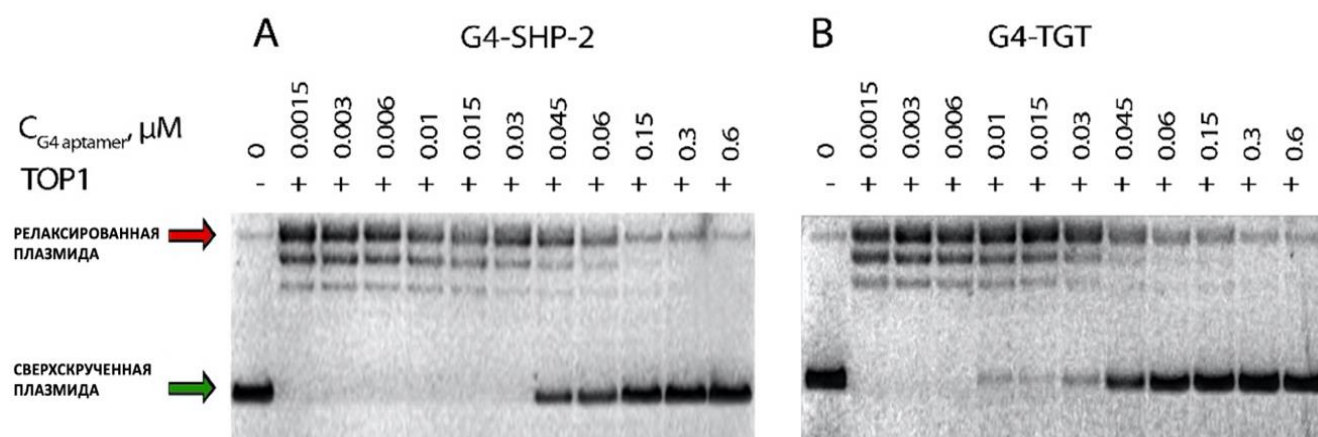


Рисунок 4 - Электрофорограмма результатов реакции релаксации плазмиды рUC19 TOP1 в присутствии олигонуклеотидов А) G4- SHP2 и G4-TGT

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 5).

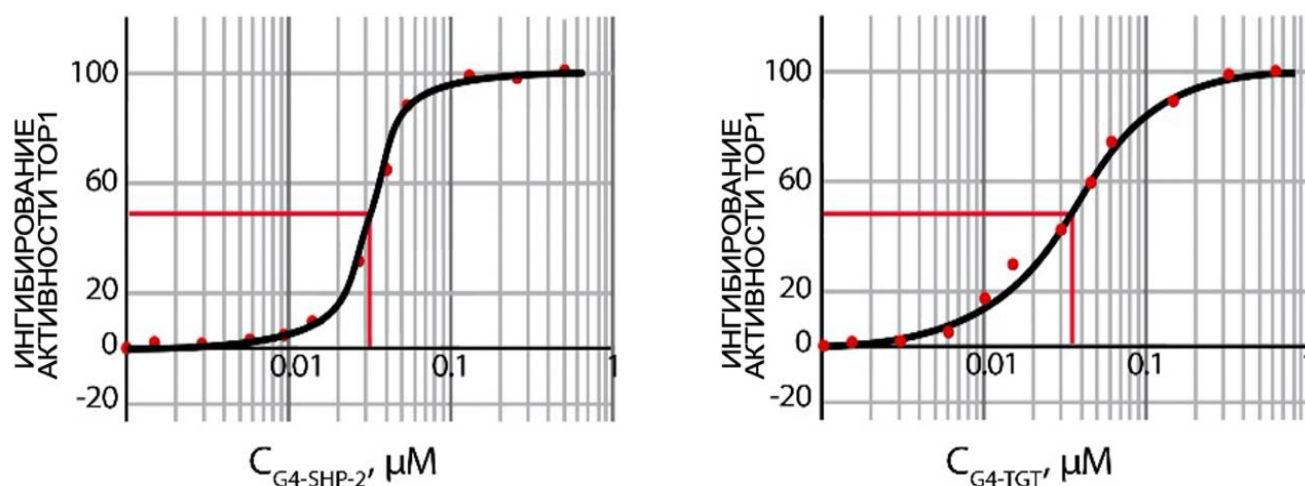


Рисунок 5 - кривые ингибирования активности TOP1 G4-аптамерами G4-SHP2 и G4-TGT соответственно

Большинство G4-аптамеров, исследуемых в работе, ингибируют TOP1 в нано- или микромолярных концентрациях (Таблица 2).

Таблица 2 – Структура G4-аптамеров и их биологические эффекты, Р- параллельный тип, Н – гибридный (3+1) или же смесь конформеров, А – антипараллельный, Un - неструктурированный олигонуклеотид

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

Высокоселективный ингибитор TOP1 камптотecin, применяемый в клинической онкологии, способен ингибировать TOP1 в концентрациях от 0,1 до 10 μM , что на порядок выше, чем лучший ингибитор TOP1 из исследуемого набора G4-аптамеров – G4-SHP2 ($\text{IC}_{50} = 0,03\mu\text{M}$). Олигонуклеотиды, неспособные формировать G4 (Random и Macugen) не подавляли ферментативную активность TOP1. Все изученные в работе G4-аптамеры проявляют ингибирующее действие в отношении TOP1 (Таблица 2). Самыми сильными ингибиторами TOP1 оказались олигонуклеотиды с наибольшей длиной G-трактов в своих последовательностях. Таким образом, увеличение количества G-тетрад повышало способность олигонуклеотидов ингибировать TOP1.

Ингибирование синтеза ДНК под действием G-богатых олигонуклеотидов

Далее была изучена способность G4-аптамеров ингибировать репликацию ДНК. Интенсивность репликации оценивали на клеточной культуре MCF-7 по интенсивности включения ^3H -тимидина во вновь синтезированную ДНК. Клетки, которые находятся в S-стадии деления, интенсивно захватывают ^3H -тимидин и включают его в новые синтезируемые нити ДНК. 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 РНК, интенсивность транскрипции не влияет уровень сигнала и не вносит погрешность в измерения.

Результаты исследования представлены в таблице 2. Все исследуемые олигонуклеотиды в концентрации 10 μM подавляли включение ^3H -тимидина во вновь синтезированную цепь ДНК (Рисунок 6, Таблица 2). 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. Олигонуклеотид случайной последовательности (Random) не обладал способностью подавлять репликацию.

Влияние G4-аптамеров на жизнеспособность клеток MCF-7 и MCF10A

Для оценки влияния G4-аптамеров на жизнеспособность на опухолевой линии клеток и сравнения с влиянием на жизнедеятельность условно-нормальной линии клеток была проведена серия МТТ-тестов на выбранных линиях клеток молочной железы - MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) и MCF10A (линия условно-нормальных клеток молочной железы). Полученные кривые выживаемости представлены на рисунке 7 и в таблице 3.

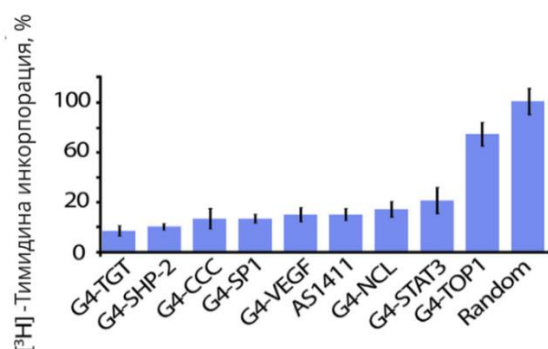


Рисунок 6 - Влияние G-богатых олигонуклеотидов на репликацию (по включению ^3H -тимидина, $M \pm SD$)

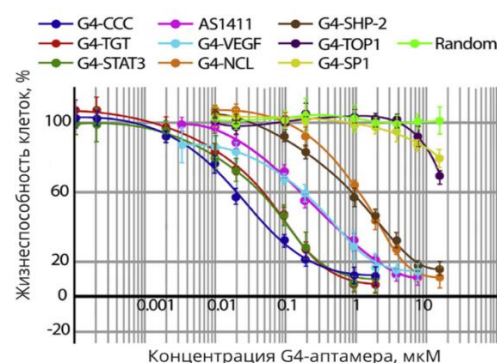


Рисунок 7 - Зависимость выживаемости клеток MCF-7 при обработке G4-аптамерами ($M \pm SD$)

Таблица 3 - Влияние G4-аптамеров на жизнеспособность клеток линии MCF-7 и MCF-10A

	Эффект на линию MCF-7	Эффект на линию MCF-10A
Группа 1 G4-STAT3 G4-NCL	Цитотоксический эффект	Отсутствие цитотоксического эффекта
Группа 2 AsGGG G4-CCC G4-TGT AS1411 G4-VEGF	Цитотоксический эффект	Слабый цитотоксического эффект
Группа 3 G4-SHP2	Отсутствие цитотоксического эффекта	Стимулирующий эффект
Группа 4 G4-SP1 G4-TOP1 Randon	Отсутствие цитотоксического эффекта	Отсутствие цитотоксического эффекта

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

Анализ плеiotропного эффекта G4-аптамеров

Было обнаружено, что олигонуклеотиды AS1411, G4-SP1, G4-STAT3 и G4-TGT, G4-CCC значительно снижают транскрипционную активность фактора STAT3, а также, что все G4-аптамеры из исследуемого набора эффективно ингибируют активность TOP1. Таким образом, был подтвержден мультинаправленный 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. К тому же нуклеолин не влияет на активность TOP1, несмотря на то, что он способен связывать данный фермент. То есть обнаруженные ингибирующие эффекты AS1411 в отношении активности STAT3 и TOP1 не связаны с его способностью подавлять активность нуклеолина.

В заключительной части представленного исследования, после демонстрации мультинаправленных эффектов нескольких G4-аптамеров, был проведен сравнительный анализ интегральной антипролиферативной активности аптамеров на клетках MCF-7 аденокарциномы молочной железы и immortalized эпителиальных клеток MCF-10A молочной железы. Семь аптамеров изучаемого набора (G4-STAT3, G4-CCC, AS1411, G4-TGT, G4-NCL, G4-VEGF и G4-SHP2) имели значительно более высокие антипролиферативные эффекты в отношении клеток MCF-7. Принимая во внимание плеiotропные свойства G4-аптамеров и их избирательную антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеток, можно рассматривать G4-аптамеры как перспективные агенты мультитаргетной терапии злокачественных новообразований.

Выводы

Представленное исследование расширяет представления о функционировании G-квадруплексов в качестве регуляторного элемента пропролиферативных процессов и апоптоза. На основании полученных результатов можно сформулировать 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 плеiotропным 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 μ M.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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). — P. 8773-8799.
2. **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). — P. 7781-7803.
3. **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. — №145. — P. 163-173.
4. 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.
5. **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 (Moscow). — 2015. — №8. — P. 1026-1038.
6. 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. — P.6994-7004.