

ВЛИЯНИЕ pH НА КОНФОРМАЦИЮ МОДИФИЦИРОВАННОГО АПТАМЕРА К БЕЛКУ НУКЛЕОЛИНУ

© 2023 г. П.В. Габрусенок*, Р.Р. Рамазанов**, А.С. Бучельников**, П.А. Соколов*, **, #

*Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

**Севастопольский государственный университет, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

#E-mail: p.a.sokolov@spbu.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 21.12.2022 г.

Поиск агентов для адресной доставки противораковых препаратов остается крайне востребованной для медицины задачей. В этой связи находят свое применение ДНК-аптамеры к белкам, специфичным к раковым клеткам. Вместе с тем дополнительная настройка активности аптамеров для снижения их аффинности к мишеням вне раковых тканей может улучшить перспективы их клинического применения ввиду сокращения иммуногенности и количества побочных эффектов. Одним из подходов является использование нарушения кислотности в раковых клетках и тканях. В данной работе мы модифицировали аптамер AS1411 к нуклеолину путем присоединения к нему нуклеотидной последовательности, сообщающей аптамеру свойство pH-чувствительности. Методами спектрофотометрического плавления и флуоресценции было продемонстрировано, что конформация нового аптамера обусловлена pH среды.

Ключевые слова: аптамер, водородный показатель, ДНК, нуклеолин, рак.

DOI: 10.31857/S0006302923020047, EDN: CAEFMD

Нуклеолин является многофункциональным белком, который задействован в процессах выживания, роста и пролиферации клеток. У нормальных клеток этот белок обнаруживается преимущественно в ядре. В раковых клетках он также присутствует в цитоплазме и на поверхности [1]. Последнее позволяет использовать его как целевой белок для доставки лекарств в опухолевые ткани [2, 3] различного вида, включая нейробластому [4], глиобластому [5], рак молочной железы [6], шейки матки [7] и колоректальный рак [8].

В настоящее время для молекулярного узнавания все чаще применяются аптамеры — высокоаффинные нуклеотидные последовательности, специфичные к молекуле-мишени и являющиеся хорошей альтернативой, например, моноклональным антителам [9, 10]. По сравнению с антителами, ДНК-аптамеры обладают рядом преимуществ. Среди них простота синтеза и стабильность, а также они обладают небольшой или нулевой иммуногенностью, что означает возможность многократного введения в терапевтических целях, а также меньшее количество побочных эффектов [11].

В качестве связывающегося с нуклеолином агента для адресной доставки лекарств широко

исследуется и успешно применяется ДНК-аптамер AS1411 [12]. Наряду со сверхэкспрессией нуклеолина раковые ткани характеризуются нарушением кислотности внутри- и внеклеточного пространств [13, 14]. Это дает еще одну возможность для дополнительной тонкой настройки агентов доставки лекарств, придавая им способность активироваться в диапазоне pH, характерном для опухолевых тканей.

Ранее, на примере аптамера к аденозинтрифосфату (АТФ), была предложена универсальная схема дополнения последовательности аптамеров участками, которые в зависимости от кислотности окружения с различной эффективностью интерферируют с функциональной структурой аптамеров и регулируют таким образом их активность при разных pH [15]. В присутствии АТФ этот аптамер претерпевает структурную перестройку, формируя сайт связывания. При этом из его структуры вытесняется интерферирующий участок, что приводит к росту фракции активных аптамеров. Для различных pH размер данной фракции существенно различается, что и обуславливает эффективность подхода. На сегодняшний день структурная перестройка при связывании с мишенью была открыта также для

Таблица 1. Используемые в исследовании олигонуклеотиды

№	Обозначение	Последовательность 5'–3'
1	AS1411	Cy3-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-BHQ2
2	AS1411-interfere	Cy3-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG- TTTTTTTTTTTTTTT-CCAACACC-BHQ2
		quad-tail GGTGGTGG-...
		interfere-tail ...-CCAACACC
3	quad	GGTGGTGG
4	dis	GGTGTTGG
5	disA14	GGTGTTGG-AAAAAAAAAAAAA
6	Cy3T8	Cy3-TTTTTTTT

Примечание. Cy3 – цианин-3; BHQ2 – Black Hole Quencher 2; интерферирующая со структурой аптамера последовательность interfere-tail выделена двойным подчеркиванием; комплементарные к interfere-tail последовательности выделены одинарным подчеркиванием; нуклеотиды, участвующие в образовании не уотсон-криковских пар (мисматчи), обозначены полужирным шрифтом.

ДНК-аптамеров к тромбину и кокаину [16]. При этом многие ДНК-аптамеры имеют консервативные сайты связывания и не изменяют своей структуры при комплексообразовании с мишенями. Поэтому работоспособность упомянутого подхода для этого типа аптамеров нуждается в дополнительном изучении.

В данной работе мы исследовали возможность придания рН-зависимости консервативным аптамерам на примере аптамера AS1411 к нуклеолину. Последовательность AS1411 была дополнена интерферирующим участком. Для решения задач исследования был разработан альтернативный подход к проверке активности используемого аптамера в зависимости от рН. Он основан на изучении гибридизации сигнальной ДНК с интерферирующим участком аптамера, а не на детекции комплексообразования с нуклеолином. Это существенно упрощает процесс изучения системы, так как нет необходимости работать с самим белком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трис(гидроксиметил)аминометан ($\geq 99.9\%$), ацетат натрия, хлорид магния и аденозинтрифосфат были закуплены в компании Sigma (США). Агароза была куплена в компании AppliChem (США). Для приготовления всех растворов использовали очищенную воду Milli-Q. Исследования проводили в буфере, содержащем 10 ммоль/л Трис-НCl, 10 ммоль/л CH_3COONa и 6 ммоль/л MgCl_2 .

Используемые в исследовании олигонуклеотиды представлены в табл. 1. Синтез проводило ООО «ДНК-Синтез» (Москва, Россия). Концентрация олигонуклеотидов AS1411, AS1411-interfere и Cy3T8 во всех опытах составляла 50 нмоль/л. Теоретическая температура плавления рассчитывалась при помощи калькулятора OligoAnalyzer (IDT, США) [17].

Плавление проводили на спектрофотометре Specord 2000 (Германия), регистрируя оптическую плотность проб на длине волны 260 нм. Градиент изменения температур во всех опытах не превышал $0.2^\circ\text{C}/\text{мин}$. Кривые плавления обработаны по алгоритму, предложенному в работе [18], и отражают долю α максимальной концентрации двунитевых участков ($\alpha = 1$).

Измерения интенсивности флуоресценции красителя Cy3 проводили с помощью флуориметра F-7100 (Hitachi, Япония) в режиме «Time scan» с напряжением на фотоумножителе 700 В. Длина волны возбуждения во всех опытах была 539 нм (ширина щели 5 нм), а интенсивность испускания измеряли на длине волны 590 нм (ширина щели 5 нм). При титровании измеряли флуоресценцию через 10 мин после добавления титрующего раствора. Исследование зависимости флуоресценции олигонуклеотида Cy3T8 от рН показало, что флуоресценция Cy3 не зависит от рН в диапазоне от 5.0 до 8.5 и составляет около 100 условных единиц.

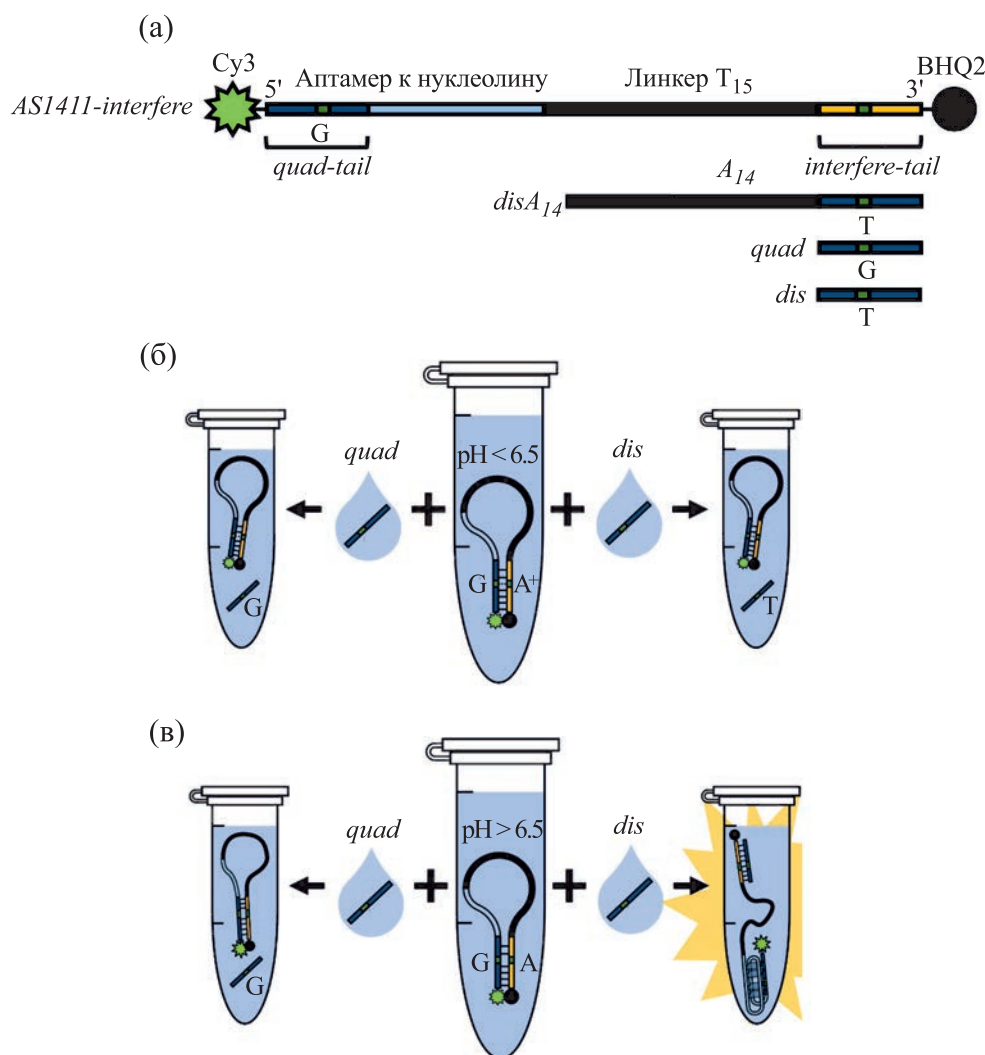


Рис. 1. Схема экспериментов по проверке pH-чувствительности выбранного дизайна сенсора (а). Случай «низкого» (б) и «высокого» (в) pH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн модифицированного аптамера к нуклеолину. Исходный аптамер к нуклеолину *AS1411*, через политиминный (полиТ) линкер был дополнен участком *interfere-tail*, который за исключением одной пары А–Г комплементарен к его концевому участку *quad-tail*. Можно предположить, что в растворе устанавливается равновесие между «выключенными» макромолекулами аптамеров, в которых участок *interfere-tail* гибризован с *quad-tail*, и «включенными» макромолекулами, в которых участок *quad-tail* включен в формирование функциональной структуры аптамера. Стабильность дуплекса *quad-tail:interfere-tail* в нейтральных и кислых pH различаются. С понижением pH пара А–Г протонируется [19], и стабильность дуплекса возрастает. Чем выше стабильность дуплекса, тем меньше фракция апта-

меров, находящихся в функциональном состоянии, и наоборот. Это придает аптамеру *AS1411-interfere* зависимость от pH. Мы полагаем, что в случае отсутствия гибридизации участков *interfere-tail* и *quad-tail* аптамер *AS1411-interfere* переходит во «включенное» состояние аналогично тому, как это происходит для исходного аптамера *AS1411* [20]. Таким образом, измерение стабильности гибридизации участка *interfere-tail* и *quad-tail* при различных pH является косвенным измерением фракции «включенных» аптамеров. Для оценки стабильности указанного дуплекса мы использовали подход конкурентного связывания сигнальных олигонуклеотидов *quad*, *dis* и *disA*₁₄ с участком *interfere-tail*, как это представлено на рис. 1. Чем эффективнее сигнальные олигонуклеотиды замещают *quad-tail* в дуплексе *quad-tail:interfere-tail*, тем менее стабилен данный дуплекс. Эффективность замещения оценивали по

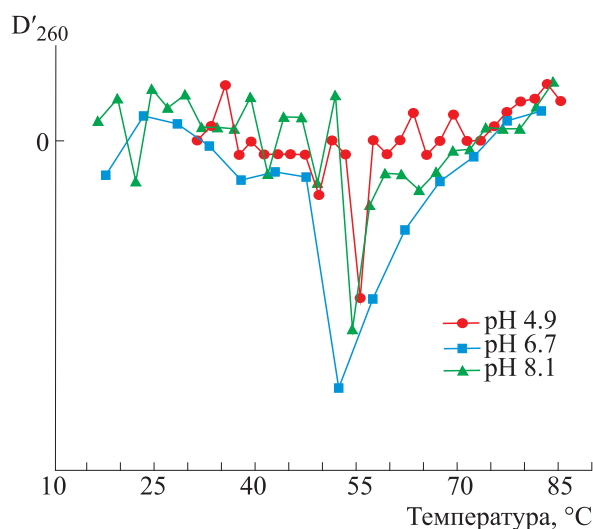


Рис. 2. Производная оптической плотности образцов NLC по температуре.

росту флуоресценции, сопровождающему разрушение дуплекса.

Изучение структуры аптамера при различных pH. Немодифицированный аптамер *AS1411* при используемых в работе ионных силах и pH формирует структуру, температура плавления которой варьируется от 52 до 56 °C (рис. 2), что соответствует литературным данным по плавлению квадруплексов [18]. Наблюдалось характерное для квадруплексов изменение оптической плотности с ростом температуры [18], заключающееся в падении коэффициента экстинкции ϵ_{260} и увеличении ϵ_{295} (данные не представлены). При этом флуоресценция аптамера *AS1411* составила 20 ± 3 усл. ед., что существенно ниже аналогичных значений для олигонуклеотида *Cy3T₈* тех же концентраций. Это также свидетельствует о том, что 5'- и 3'-концы аптамера *AS1411*, модифицированные красителем и тушителем, находятся рядом, как и предполагает структура квадруплекса. Поэтому можно заключить, что в изучаемом диапазоне pH аптамер *AS1411* формирует свою функциональную квадруплексную форму.

Для модифицированного аптамера *AS1411-interfere* также наблюдали низкую интенсивность флуоресценции (18 ± 1 усл. ед. в диапазоне pH от 4.7 до 8.1). Это возможно в случае, если участок *quad-tail* комплементарно связан с участком *interfere-tail*. При этом, соответственно, *quad-tail* не участвует в формировании квадруплекса и аптамер теряет функциональность. Доля «выключенных» аптамеров зависит от стабильности дуплекса *quad-tail:interfere-tail*. В свою очередь, чем менее стабилен данный дуплекс, тем легче цепочка *quad-tail* в нем может быть замещена на один из

олигонуклеотидов *quad*, *dis* и *disA₁₄* с образованием нового более стабильного дуплекса [21].

Можно ожидать, что олигонуклеотид *quad* замещает участок *quad-tail* с одинаковой эффективностью во всем диапазоне pH, так как их последовательности полностью совпадают. Однако титрование раствора *AS1411-interfere* с помощью *quad* не вызвало роста флуоресценции во всех случаях. Такое поведение мы, в первую очередь, связываем с тем, что олигонуклеотид *quad*, являясь частью последовательности квадруплекса, может собираться в подобные структуры по четыре макромолекулы. Это препятствует его взаимодействию с участком аптамера *interfere-tail*.

Олигонуклеотиды *dis* и *disA₁₄* имеют один нуклеотид, отличный от последовательности квадруплекса, поэтому формирование ими в растворе подобных надструктур маловероятно. На рис. 3а показано, как изменяется интенсивность флуоресценции метки *Cy3* при титровании раствора *AS1411-interfere* раствором олигонуклеотида *dis*. При pH < 6.0 увеличение концентрации олигонуклеотида *dis* в растворе не приводит к существенному изменению сигнала. Олигонуклеотид *dis* при указанных pH не способен заместить *quad-tail* в дуплексе *quad-tail:interfere-tail*, так как такой дуплекс стабилизируется в кислых pH дополнительно парой $A^+ \cdot G$. При pH > 6.0 наблюдается существенный рост флуоресценции, связанный с гибридизацией олигонуклеотида *dis* с *interfere-tail* и разнесением тушителя на *interfere-tail* и красителя на *quad-tail*, как показано на рис. 1. В то же время олигонуклеотид *disA₁₄*, содержащий дополнительную последовательность поли(A), во всем диапазоне pH приводит к возрастанию флуоресценции (рис. 3б). Это хорошо согласуется с тем, что расчетная температура плавления дуплекса *disA₁₄:interfere-tail* в два раза выше температуры плавления дуплекса *quad-tail:interfere-tail*. Также линкер полиТ в аптамере *AS1411-interfere* является точкой опоры для реакции с *disA₁₄*, что существенно ускоряет протекание реакции [21]. Уже при соотношении концентраций *disA₁₄:AS1411-interfere*, равном 1:1, наблюдается выход зависимостей на плато вне зависимости от pH. Это полностью соответствует схеме гибридизации.

В отличие от олигонуклеотида *disA₁₄*, который имеет большую аффинность к аптамеру *AS1411-interfere*, а именно его участку *interfere-tail*, благодаря длинной комплементарной последовательности, олигонуклеотид *dis* и участок аптамера *quad-tail* имеют сопоставимые константы связывания с *interfere-tail* ввиду того, что конкуренция между ними за связывание с этим фрагментом практически отсутствует. В результате в растворе возникает фракция аптамера *AS1411-interfere*, в

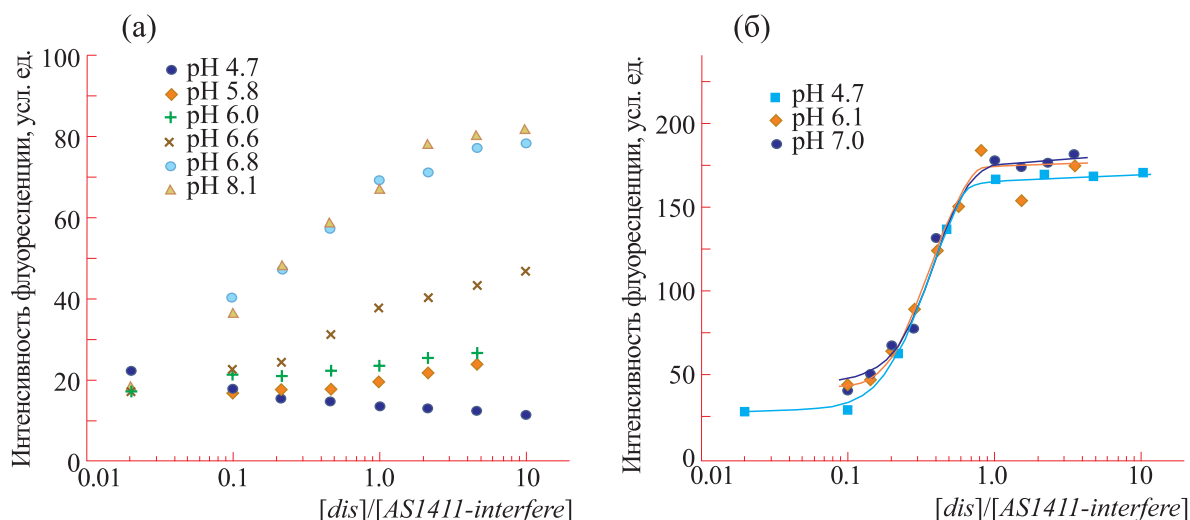


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции растворов аптамера *AS1411-interfere* от концентрации олигонуклеотидов *dis* (а) и *disA14* (б) при различных pH.

которой он имеет форму шпильки, и образуется дуплекс *quad-tail:interfere-tail*, и фракция, в которой он принимает форму квадруплекса, а его участок *interfere-tail* образует дуплекс *dis:interfere-tail*. По соотношению этих двух фракций можно судить о стабильности дуплекса *quad-tail:interfere-tail*. Как следует из рис. 4, при низких pH дуплекс *quad-tail:interfere-tail* стабилен, аптамер находится в «выключенном» состоянии. При $pH > 6.0$ дуплекс относительно нестабилен и доля «включенных» аптамеров должна расти, что согласуется с дизайном аптамера *AS1411-interfere*.

При соотношении *dis* и аптамера *AS1411-interfere*, равному 1:1, как видно из рис. 4, при $pH < 6.0$ практически не происходит замещения *quad-tail* на *dis*. При $pH 6.5$ замещение происходит примерно для половины аптамеров от максимального количества, которое достигается в области $pH > 7.0$. Известно, что наличие некомплементарных оснований А–Г в двойной спирали нуклеиновых кислот значительно понижает их стабильность и температуру плавления при нейтральных pH и существенно повышает в кислых [22]. Основываясь на этом, можно предположить, что температура плавления дуплексов *quad-tail:interfere-tail* больше температуры плавления дуплексов *dis:interfere-tail* в кислых pH и наоборот – в нейтральных. Если к началу плавления в растворе присутствуют две фракции *quad-tail:interfere-tail* и *dis:interfere-tail*, то при повышении температуры сначала будет плавиться фракция с более низкой температурой плавления. При этом значительного изменения поглощения наблюдаться не будет, так как высвободившийся *interfere-tail* будет вовлечен в формирование дуплекса в более стабильной фракции. Этот процесс будет идти пока первая фракция полностью не распла-

вится. С дальнейшим повышением температуры будет происходить денатурация оставшейся наиболее стабильной фракции. Действительно, при плавлении растворов *dis* и аптамера *AS1411-interfere* в соотношении 1:1 во всех областях pH наблюдается только один переход (рис. 5а), несмотря на наличие двух фракций для pH 6.5 и 7.3 (рис. 4). При pH 7.3 некомплементарная пара А–Г в дуплексе *quad-tail:interfere-tail* не протонирована и во время плавления фракция этого дуплекса переходит во фракцию *dis:interfere-tail*. При понижении pH пара A^+-G стабилизирует дуплекс и фракция *dis:interfere-tail* с повышением температуры переходит во фракцию *quad-tail:interfere-tail*, которая имеет повышенную темпера-

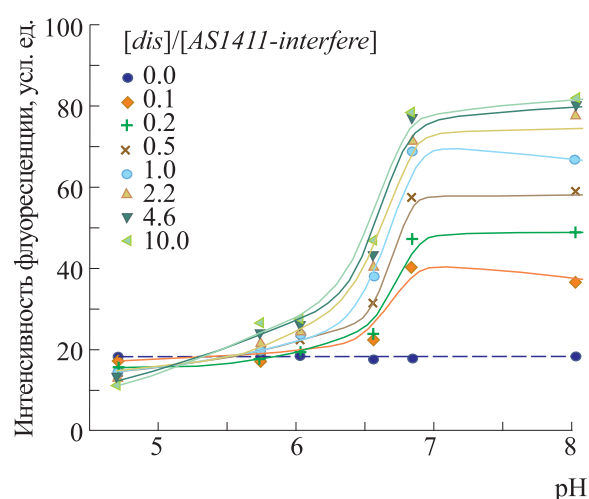


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции растворов аптамера *AS1411-interfere*, содержащих различные концентрации *dis*, от pH.

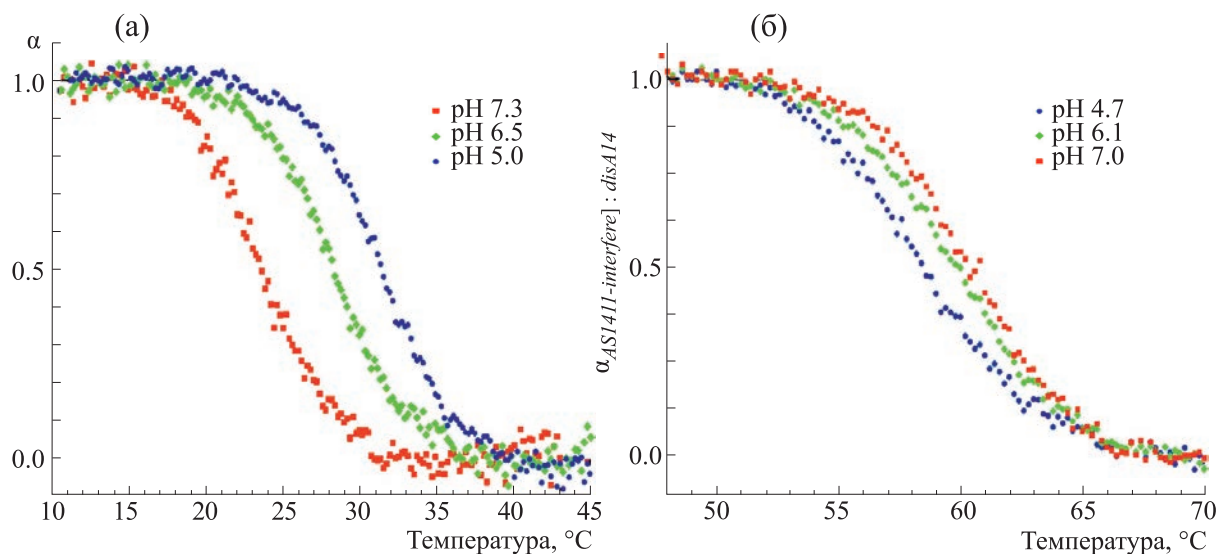


Рис. 5. Кривые плавления растворов *AS1411-interfere*, содержащих олигонуклеотиды *dis* (а) или *disA14* (б). *AS1411-interfere:dis = AS1411-interfere:disA14 = 1:1*.

туру плавления. Противоположная зависимость температуры плавления от pH наблюдается для комплексов аптамера *AS1411-interfere* с *disA14* (рис. 5б). Так как дуплекс *disA14:interfere-tail* плавится в области 60°C, что существенно выше, чем 30°C для *quad-tail:interfere-tail*, то перераспределение фракций во всем диапазоне pH отсутствует. При этом наблюдается небольшое падение температуры плавления с уменьшением pH, которое можно соотнести с дестабилизацией самого дуплекса *disA14:interfere-tail* в кислой среде. Кривые плавления комплексов аптамера с олигонуклеотидами *dis* и *disA14* полностью соответствуют схеме работы pH-зависимого аптамера *AS1411-interfere*.

ВЫВОДЫ

Продemonстрированный в данной работе подход по изучению конформации модифицированного аптамера *AS1411* при помощи сигнальных олигонуклеотидов представляется весьма перспективным. Методика не требует работы непосредственно с мишенью — нуклеотином. Полученные с ее помощью результаты полностью согласуются с ранее описанным механизмом действия интерферирующей последовательности, несущей некомплементарный нуклеотид.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-01066).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. Mongelard and P. Bouvet, Trends Cell Biol., **17** (2), 80 (2007).
2. S. Christian, J. Pilch, M. E. Akerman, et al., J. Cell Biol., **163** (4), 871 (2003).
3. J. Mosafer and A. Mokhtarzadeh, Curr. Drug Delivery, **15** (9), 1323 (2018).
4. C. Brignole, V. Bensa, N. A. Fonseca, et al., J. Exp. Clin. Cancer Res., **40** (1), 180 (2021).
5. J. Balça-Silva, A. do Carmo, H. Tão, et al., Exp. Cell Res., **370** (1), 68 (2018).
6. V. Moura, M. Lacerda, P. Figueiredo, et al., Breast Cancer Res. Treat., **133** (1), 61 (2012).
7. J. Carvalho, A. Paiva, M. P. Cabral Campello, et al., Sci. Rep., **9** (1), 7945 (2019).
8. N. F. Hosseini, R. Amini, M. Ramezani, et al., Biomed. Pharmacother., **155**, 113690 (2022).
9. С. П. Радько, С. Ю. Рахметова, Н. В. Бодоев и др., Биомед. химия, **53** (1), 5 (2007).
10. С. А. Лапа, В. Е. Шершов, Г. С. Краснов и др., Биоорг. химия, **46** (4), 411 (2020).
11. Z. Fu and J. Xiang, Int. J. Mol. Sci., **21** (8), 2793 (2020).
12. R. Yazdian-Robati, P. Bayat, F. Oroojalian, et al., Int. J. Biol. Macromol., **155**, 1420 (2020).

13. B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, et al., *Nat. Rev. Cancer*, **11** (9), 671 (2011).
14. M. Damaghi, J. W. Wojtkowiak, and R. J. Gillies, *Front. Physiol.* **4**, 370 (2013).
15. I. A. P. Thompson, L. Zheng, M. Eisenstein, et al., *Nat. Commun.*, **11** (1), 2946 (2020).
16. M. Debiais, A. Lelievre, M. Smietana, et al., *Nucl. Acids Res.*, **48** (7), 3400 (2020).
17. <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.
18. P. A. Rachwal and K. R. Fox, *Methods*, **43** (4), 291 (2007).
19. J. A. Lee and M. C. DeRosa, *Chem. Commun.*, **46** (3), 418 (2010).
20. L. Bie, Y. Wang, F. Jiang, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 1025313 (2022).
21. F. C. Simmel, B. Yurke, and H. R. Singh, *Chem. Rev.*, **119** (10), 6326 (2019).
22. S. E. Morse and D. E. Draper, *Nucl. Acids Res.*, **23** (2), 302 (1995).

Study of the Influence of pH on the Conformation of a Modified Aptamer to Nucleolin Protein

P.V. Gabrusenok*, R.R. Ramasanoff, A.S. Buchelnikov**, and P.A. Sokolov*, ****

**Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

***Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia*

The search for agents for targeted delivery of anticancer drugs remains a crucial challenge for medicine. For this reason, DNA aptamers targeting cancer cell-specific proteins have medical use. At the same time, the additional fine-tuning of aptamer properties to lower affinity of aptamers for target cells that are not surrounding cancerous tissues makes the aptamers promising tools in clinical applications due to reduced immunogenicity and fewer side effects. One of the approaches is to use acidity disruption in cancer cells and tissues. In this work, aptamer AS1411 was modified to increase affinity for nucleolin by attaching a nucleotide sequence to its binding site to create a pH-sensitive linker. UV melting and fluorescence methods were employed to demonstrate that the conformation of the new aptamer depends on pH of the medium.

Keywords: aptamer, pH, DNA, nucleolin, cancer