

На правах рукописи

ПЕТРОВА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

**ХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ МОДИФИКАЦИИ
АНТИ-*MDR1* МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК КАК ФАКТОРЫ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ НУКЛЕАЗОУСТОЙЧИВОСТЬ,
БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ПРОНИКНОВЕНИЯ В КЛЕТКИ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научный руководитель:

к.х.н. Черноловская Елена Леонидовна

Официальные оппоненты:

д.х.н., профессор Готтих Марина Борисовна

к.х.н. Малыгин Алексей Аркадьевич

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии им. академиков

М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Защита состоится « ___ » _____ 2011 г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при Институте
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « ___ » _____ 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Разработка терапевтических препаратов для лечения заболеваний, связанных с нарушением экспрессии определенных генов, представляет собой важную задачу фармакологии. Перспектива использования малых интерферирующих РНК (siРНК), являющихся эффекторами РНК-интерференции, в качестве терапевтических препаратов является многообещающей, поскольку на основе siРНК могут быть созданы специфические ингибиторы экспрессии любого гена-мишени. Однако широкое применение siРНК в терапии пока невозможно из-за недостаточной эффективности РНК-интерференции *in vivo*, связанной с неэффективной доставкой siРНК в клетки, высокой чувствительностью к действию нуклеаз, а также проблемой выбора эффективных siРНК. Химическая модификация и модификация структуры siРНК-дуплексов успешно используются для улучшения свойств siРНК, однако отсутствие универсального подхода к конструированию siРНК, объединяющего различные типы модификаций в одной молекуле, пока не позволяет получить siРНК, пригодные для биомедицинского применения. Таким образом, исследования, направленные на оптимизацию дизайна siРНК с целью получения высокоактивных ингибиторов длительного действия, направленных к любой mРНК-мишени, являются актуальными.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния химических модификаций и модификаций структуры дуплекса siРНК, направленных к mРНК гена *MDR1*, на эффективность и длительность их действия, а также на способность проникать в клетки. В ходе исследования решались следующие задачи:

- ✓ исследовать влияние количества и положения 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов в составе siРНК на ее нуклеазоустойчивость, интерферирующую активность и длительность ингибирующего действия;
- ✓ исследовать влияние нуклеотидных замен в составе селективно модифицированных siРНК на их интерферирующую активность, нуклеазоустойчивость и длительность ингибирующего действия;
- ✓ исследовать влияние липофильных модификаций, введенных на 5'-конец смысловой цепи siРНК, на эффективность их проникновения в раковые клетки, эффективность и длительность ингибирующего действия.

Научная новизна и практическая ценность работы. В данной работе впервые проведено исследование влияния селективной химической модификации siРНК на ее нуклеазоустойчивость и интерферирующую активность. Показано, что анти-*MDR1* siРНК, содержащие 2'-О-метильные аналоги нуклеотидов, расположенные в нуклеазочувствительных сайтах дуплекса, стабильны в присутствии сыворотки и обладают более длительным действием по сравнению с немодифицированными аналогами. Мы использовали подход, основанный на селективной модификации в совокупности с модификацией структуры siРНК, заключающейся в снижении термостабильности дуплекса с 3'-конца смысловой цепи или центральной

части дуплекса путем введения нуклеотидных замен, приводящих к образованию «мисматчей». Впервые получены анти-*MDR1* siРНК, содержащие 4 «мисматча» с 3'-конца смысловой цепи, стабильные в присутствии 10 % сыворотки. Длительность действия данных siРНК превышает длительность действия селективно модифицированных siРНК с «совершенной» структурой дуплекса. Мы предполагаем, что стратегия объединения химической модификации и модификации структуры дуплекса может быть использована для получения высокоактивных siРНК длительного действия, направленных к любой последовательности мРНК гена-мишени. Вторая часть работы представляет собой первое в своем роде систематическое исследование влияния длины алифатического линкера, связывающего остаток липофильной молекулы и siРНК, на эффективность проникновения данных производных в клетки в отсутствие трансфекционных агентов. Установлено, что способность липофильных производных siРНК проникать в клетки увеличивается при удлинении алифатического линкера между siРНК и липофильным остатком от 0 до 12 атомов углерода. Показано, что холестерин-содержащая siРНК с аминокетильным линкером проявляет более высокую биологическую активность по сравнению с остальными липофильными производными, а удлинение или укорочение линкера снижает биологическую активность. Таким образом, оптимизация длины линкера, связывающего липофильный остаток с siРНК является одним из ключевых аспектов дизайна липофильных производных siРНК.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы. Результаты работы представлены на конференциях: «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2007), «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2007, 2008, 2010), «Медицинская геномика и протеомика» (Новосибирск, 2009), VI Всероссийском Научном Семинаре «Химия и медицина» (Уфа, 2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), международной летней школе «Supramolecular systems in chemistry and biology» (Туапсе, 2008), 4-й международной конференции «RNAi2009: ncRNA: Bridging Biology and Therapy» (Оксфорд, Великобритания, 2009), 3-ей международной конференции FEBS «ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases» (Инсбрук, Австрия, 2010), первом симпозиуме «Supramolecular Chemistry for Materials and Life Sciences» (Новосибирск, 2010).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 137 страницах, содержит 37 рисунков и 8 таблиц. Библиография содержит 229 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Алгоритм селективной модификации нуклеозочувствительных сайтов siРНК

Химические модификации в составе siРНК в первую очередь используются для увеличения их нуклеазоустойчивости с целью увеличения продолжительности действия siРНК. Известно, что расщепление siРНК в присутствии сыворотки происходит, в основном, под действием эндорибонуклеаз, и его характер соответствует типу расщепления РНКазой А, при котором 2'-ОН группа рибозы участвует в разрыве фосфодиэфирной связи по механизму трансэтерификации. Поэтому использование 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов в составе siРНК способствует увеличению их нуклеазоустойчивости. Однако такая модификация зачастую снижает биологическую активность siРНК, причем наблюдается обратная зависимость ее активности от количества 2'-О-метильных звеньев. Ранее в нашей лаборатории был предложен алгоритм, позволяющий минимизировать число 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов в составе дуплекса. На первом этапе проводится картирование нуклеазочувствительных сайтов siРНК в присутствии сыворотки (FBS); на втором этапе выявленные сайты защищают путем введения 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов; на третьем – оценивается нуклеазоустойчивость модифицированных аналогов siРНК в присутствии FBS. В соответствии с предложенным алгоритмом был получен 2'-О-метильный аналог анти-*MDR1* siРНК, siEm, содержащий 11 2'-О-метильных звеньев в нуклеазочувствительных сайтах дуплекса (Таблица 1). Мы исследовали влияние селективной модификации на свойства siEm.

Таблица 1. Олигорибонуклеотиды и siРНК использованные в работе ¹⁾

мРНК-мишень (no. M14758)	siРНК ²⁾	Последовательность ³⁾	T _m ⁴⁾ , °C
598-618 н.	оц-siE	5'- GUCCAGCCCCAUGGAUGAUGG -3'	-
	оц-siEm	5'- GUCCAGCCCCAUGGAUGAUGG -3'	-
	оц-siEm**	5'- GUCCAGCCCCAUGGAUGAUGG -3'	-
	siE	5'- AUCAUCCAUGGGCUGGACUU -3' 3'- GGUAGUAGGUACCCCGACCUG -5'	81.5
	siEm	5'- AUCAUCCAUGGGCUGGACUU -3' 3'- GGUAGUAGGUACCCCGACCUG -5'	84.5

598-618 н.	siErm	5'- <u>AUCAUCCAUGGGGCUGGACUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	83.5
	siEm**	5'- <u>AUCAUCCAUGGGGCUGGACUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	91
	fsiE-1m	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUGGAGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	83
	fsiE-2m	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUGGCGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	84
	fsiE-4	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUUACGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	75
	fsiE-4m	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUUACGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	76.8
	fsiE-4m+	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUUACGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	77
	fsiE-4m*	5'- <u>AUCAUCCAUGGGGCUUACGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	79.8
	fsiE-4m**	5'- <u>AUCAUCCAUGGGGCUUACGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	80
	fsiE-6m	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGACUACGUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	71
	fsiE+4m	5'- <u>CGACUCCAUGGGGCUGGACUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	84
	siE/3GUm	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUUGGACUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACUUUGACCUG</u> -5'	64.5
	siE/4GUm	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUUGGACUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUUUUUUGACCUG</u> -5'	59
	siE/3GAm	5'- AU <u>CAUCCAUGGGGCUUGGACUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACAAGACCUG</u> -5'	63
siE/3ACm	5'- AU <u>CAUCCAUGAAACUGGACUU</u> -3' 3'- <u>GGUAGUAGGUACCCCGACCUG</u> -5'	60	

598-618 н.	siE/4ACm	5'- AU <u>C</u> AU <u>C</u> CAU <u>4444</u> CU <u>G</u> GAC <u>U</u> U -3' 3'- GG <u>U</u> AG <u>U</u> AG <u>G</u> U <u>A</u> CC <u>C</u> CGAC <u>C</u> UG -5'	52.5
424-444 н.	siFm	5'- AU <u>G</u> GAUCU <u>U</u> GAAGGGGACCGC -3' 3'- CUUAC <u>C</u> CUAGA <u>A</u> CU <u>U</u> CCCCUGG -5'	81
	fsiF-4m	5'- AU <u>G</u> GAUCU <u>U</u> GAAGGG <u>U</u> CGGGC -3' 3'- CUUAC <u>C</u> CUAGA <u>A</u> CU <u>U</u> CCCCUGG -5'	68.3
586-606 н.	siHm	5'- ACU <u>U</u> GGC <u>U</u> GCC <u>A</u> UCA <u>U</u> CC <u>A</u> U -3' 3'- CUUGAA <u>A</u> CCGAC <u>G</u> GU <u>A</u> GU <u>A</u> GG -5'	80.2
	fsiH-4m	5'- ACU <u>U</u> GGC <u>U</u> GCC <u>A</u> UC <u>CC</u> GGAU -3' 3'- CUUGAA <u>A</u> CCGAC <u>G</u> GU <u>A</u> GU <u>A</u> GG -5'	72.4
652-672 н.	siJm	5'- GA <u>U</u> AUCU <u>U</u> GC <u>A</u> AAU <u>G</u> CAGGA -3' 3'- GU <u>C</u> UA <u>U</u> AGAA <u>A</u> CGU <u>U</u> AC <u>G</u> U <u>C</u> -5'	68.4
	fsiJ-4m	5'- GA <u>U</u> AUCU <u>U</u> GC <u>A</u> AAU <u>U</u> GC <u>U</u> GA -3' 3'- GU <u>C</u> UA <u>U</u> AGAA <u>A</u> CGU <u>U</u> AC <u>G</u> U <u>C</u> -5'	58
Первый интрон гена <i>MDR1</i> человека	оц-silm	5'- AAAUC <u>U</u> GAAAGCC <u>U</u> GAC <u>A</u> CUU -3'	-
	silm	5'-G <u>U</u> G <u>U</u> CAGGC <u>U</u> UUCAGAU <u>U</u> CC-3' 3'-UUCACAG <u>U</u> CCGAAAG <u>U</u> CUAAA-5'	-
-	siSCRm	5'- CAAGUC <u>C</u> GU <u>A</u> GU <u>A</u> GU <u>G</u> GUU -3' 3'- UUG <u>U</u> UCAGAGCA <u>U</u> ACA <u>U</u> CAC <u>C</u> -5'	-

¹⁾ Все олигорибонуклеотиды были синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН.

²⁾ Буква «f» указывает на «вилкоподобную» («fork»)-like структуру siРНК, буквой «m» обозначены siРНК, содержащие 2'-О-метильные аналоги нуклеотидов в нуклеазочувствительных сайтах, «m+» – siРНК, содержащие модификации в нуклеазочувствительных сайтах, включая дополнительные сайты, картированные для fsiE-4m, «m*» – siРНК, содержащие полностью модифицированную смысловую цепь, «m**» – siРНК, обе цепи которой полностью модифицированы. -1,-2,-3,-4 и -6 соответствуют количеству нуклеотидных замен с 3'-конца смысловой цепи fsiРНК, +4 соответствует четырем заменам с 5'-конца смысловой цепи. Курсивом обозначены нуклеотидные замены в смысловой или антисмысловой цепях.

³⁾ C и U – 2'-О-метильные аналоги С и U соответственно.

⁴⁾ Tm – температура плавления siРНК, измерена Ломзовым А. А. (ИХБФМ СО РАН).

1.1 Исследование влияния 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов в нуклеозочувствительных сайтах дуплекса на стабильность siРНК в присутствии сыворотки

Исследование нуклеазоустойчивости siEm проводили в ростовых средах IMDM и DMEM. Было показано, что модификация нуклеозочувствительных сайтов siРНК эффективно защищает дуплекс от действия рибонуклеаз в присутствии в среде IMDM 50 % FBS ($\tau_{1/2}$ для siEm составило ~ 8 ч), тогда как такое же количество 2'-О-метильных звеньев в сайтах, отличных от нуклеозочувствительных, в siErm лишь незначительно увеличило его стабильность по сравнению с исходным немодифицированным дуплексом siE: $\tau_{1/2} \sim 1$ ч и 30 мин, соответственно (рис. 1). В среде DMEM с 10 % FBS нуклеазоустойчивость siEm также значительно превышала стабильность немодифицированной siE. Таким образом, использование селективной модификации нуклеозочувствительных сайтов siРНК позволило минимизировать количество 2'-О-метильных звеньев, обеспечив при этом высокую нуклеазоустойчивость siРНК.

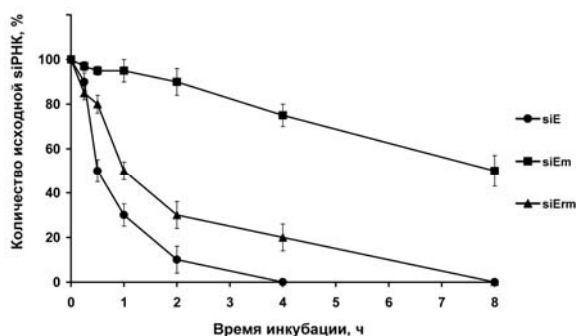


Рис. 1. Кинетика расщепления siE и ее 2'-О-метильных аналогов в ростовой среде IMDM с 50 % FBS.

1.2 Исследование интерферирующей активности анти-*MDR1* siРНК в клетках НЕК 293

Исследование биологической активности siEm проводили методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуорометрии. Для этого в качестве компонента модельной системы была использована рекомбинантная плазида pEGFP/MDR1 со встроенным химерным геном, кодирующим фрагмент 293 – 751 н. мРНК гена *MDR1* в составе единого транскрипта с мРНК гена, кодирующего зеленый флуоресцентный белок EGFP. Таким образом, эффективность действия siРНК оценивали по снижению уровня флуоресценции EGFP. При оценке активности siРНК методом флуоресцентной микроскопии, мы показали, что ингибирующее действие siEm (65 % при концентрации 100 нМ) сопоставимо с эффективностью действия немодифицированной siE, тогда как экспрессия гена-мишени под действием siErm (100 нМ) снижалась лишь на 45 % (рис. 2). Аналогичные

данные были получены методом проточной цитофлуорометрии. Таким образом, защита нуклеозочувствительных сайтов siРНК позволяет не только значительно повысить стабильность siРНК в присутствии сыворотки, но также избежать снижения ее интерферирующей активности.

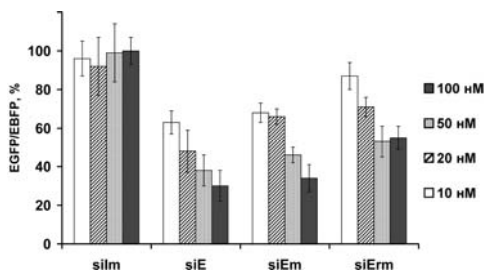


Рис. 2. Интерферирующая активность siE и ее 2'-О-метильных аналогов. В качестве контроля эффективности трансфекции использовали плазмиду pEBFP-N1, кодирующую голубой флуоресцентный белок. В качестве контроля специфичности действия – siРНК silM (Таблица 1).

1.3 Исследование длительности ингибирующего действия селективно модифицированной siEm

Методом флуоресцентной микроскопии было показано, что через 4 суток после трансфекции уровень подавления экспрессии гена-мишени *EGFP/MDR1* под действием siE и siEm был сопоставим: около 55 %. Тогда как через 6 суток с момента трансфекции уровень ингибирования экспрессии гена-мишени по действием siEm составлял 40 %, а эффективность действия siE и siErm снижалась до 20 % (рис. 3). Таким образом, использование алгоритма селективной модификации является перспективным подходом для создания активных нуклеозоустойчивых 2'-О-метильных аналогов siРНК. Предположительно, данный алгоритм может быть использован для любых siРНК вне зависимости от их нуклеотидной последовательности.

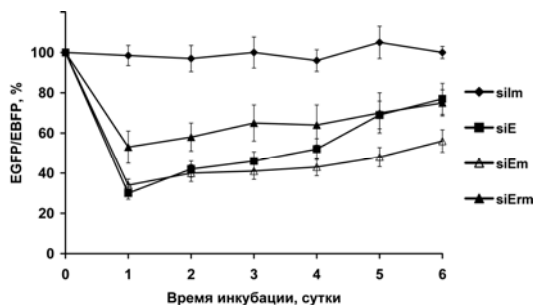


Рис. 3. Длительность действия siE и ее 2'-О-метильных аналогов. Клетки НЕК 293 ко-трансфицировали siРНК и плазмидами pEGFP/MDR1 и pEBFP-N1, после чего инкубировали от 1 до 6 суток. Анализ проводили методом флуоресцентной микроскопии.

2. Влияние структуры siРНК на их свойства

В роли индукторов РНК-интерференции могут выступать не только «классические» 21-звенные дуплексы siРНК, но и siРНК, содержащие неканонические пары или «мисматчи», а также одноцепочечные 21-звенные

олигорибонуклеотиды (оц-siРНК). Мы исследовали влияние структуры анти-*MDR1* siРНК на их свойства.

2.1 Одноцепочечные аналоги siРНК: нуклеазоустойчивость и интерферирующая активность

Известно, что эффективность действия оц-siРНК значительно ниже по сравнению с активностью дуплекса siРНК (дц-siРНК), направленной к той же последовательности. Одной из причин может быть более высокая чувствительность оц-олигорибонуклеотидов к действию рибонуклеаз по сравнению с дуплексами. В нашей работе было проведено исследование влияния нуклеазоустойчивости оц-siРНК типа Е (Таблица 1) на эффективность их действия. Показано, что нуклеазоустойчивость оц-siEm ниже нуклеазоустойчивости siEm, однако сопоставима с нуклеазоустойчивостью siE (рис. 4). При этом эффективность действия

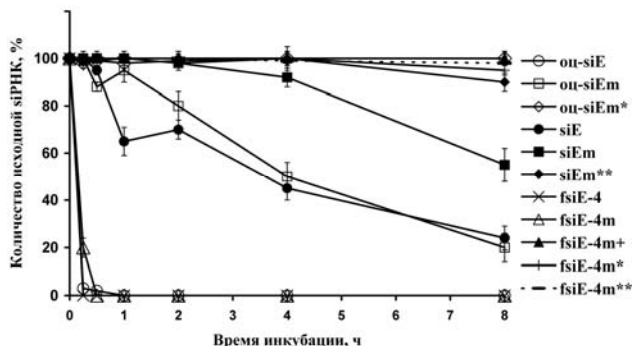


Рис. 4. Кинетика расщепления 2'-О-метильных аналогов siE в ростовой среде DMEM с 10% FBS.

оц-siРНК была сопоставима с активностью дц-siРНК лишь при самой высокой концентрации – 100 нМ. Более низкая активность оц-siEm по сравнению с siE, обладающей сходной нуклеазоустойчивостью, вероятно, связана с различием в эффективности взаимодействия оц-siРНК и дц-siРНК с белками, участвующими в РНК-интерференции. Таким образом, несмотря на более низкую стоимость синтеза оц-siРНК по сравнению с дц-siРНК, более перспективным подходом для направленного подавления экспрессии генов является использование siРНК-дуплексов.

2.2 «Вилкоподобные» siРНК: активность, нуклеазоустойчивость и длительность ингибирующего действия

Известно, что различие термостабильности концов дуплекса siРНК (термоасимметрия) определяет потенциал ее действия. Так, наличие в структуре с 3'-конца смысловой цепи «мисматчей» приводит к усилению интерферирующей активности siРНК, однако появление одноцепочечных участков снижает нуклеазоустойчивость таких «вилкоподобных» siРНК. Для получения нуклеазоустойчивых 2'-О-метильных аналогов «вилкоподобных» siРНК мы применили селективную модификацию. В работе использовали

«вилкоподобные» аналоги siEm: fsiE-1m, fsiE-2m, fsiE-4m и fsiE-6m, содержащие 1, 2, 4 и 6 неспаренных оснований с 3'-конца смысловой («пассажирской») цепи, соответственно (Таблица 1). В качестве отрицательного контроля был использован дуплекс fsiE+4m с 4 заменами с 5'-конца смысловой цепи. С помощью проточной цитофлуорометрии было показано, что данная siРНК не проявляла интерферирующую активность (рис. 5). Формирование 1 или 2 «мисматчей» с 3'-конца смысловой цепи не приводило к увеличению активности siРНК, тогда как «вилкоподобные» siРНК с 4 и 6 «мисматчами» подавляли экспрессию гена-мишени более эффективно по сравнению с исходной siEm (рис. 5).

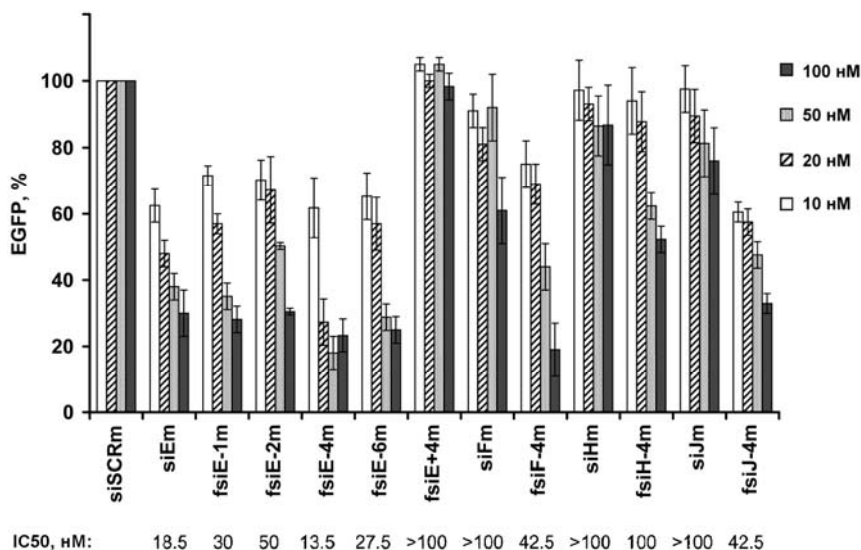


Рис. 5. Влияние изменения термоасимметрии дуплекса 2'-О-метильных аналогов siРНК на их интерферирующую активность. siРНК и рекомбинантную плазмиду pEGFP/MDR1 ко-трансфицировали в клетки НЕК 293, используя Липофектамин 2000 (далее по тексту, Липофектамин). Через 24 ч измеряли уровень сигнала EGFP с помощью проточной цитофлуорометрии. В качестве контроля использовали siSCRm, не имеющую гомологии с мРНК человека, крысы или мыши.

Формирование 4 и 6 «мисматчей» в составе siEm способствовало значительному снижению ее T_m (Таблица 1): ΔT_m для fsiE-4m составило 7.7°C и 13.5°C – для fsiE-6m. Показано, что более высокой активностью обладала fsiE-4m: концентрация, при которой наблюдалось 50 % ингибирование экспрессии гена-мишени (IC_{50}) составила 13.5 нМ, тогда как IC_{50} siEm – 18.5 нМ (рис. 5). Более низкая активность fsiE-6m (IC_{50} 27.5 нМ) могла быть связана с неблагоприятными конформационными изменениями

или значительной дестабилизацией дуплекса, вызванными нуклеотидными заменами. Таким образом, при дизайне «вилкоподобных» siРНК необходимо учитывать конформационные «предпочтения» белков, участвующих в РНК-интерференции, а также сохранять баланс между термоасимметрией и общей термостабильностью siРНК. При сравнении биологической активности серии селективно модифицированных siРНК, направленных к другому участку гена *MDR1* (Таблица 1), с активностью их «вилкоподобных» вариантов с 4 «мисматчами» было показано, что «вилкоподобные» siРНК более активны (рис. 5). Эти данные коррелируют с нашими данными по подавлению синтеза Р-гликопротеина в клетках KB-8-5, согласно которым, эффективность действия «вилкоподобных» siРНК в 1.2 – 1.8 раза превышала активность «классических» siРНК.

Исследование нуклеазоустойчивости siРНК показало, что в большинстве случаев стабильность «вилкоподобных» siРНК ниже, чем стабильность «классических» siРНК. Вероятно, в результате изменений контекста последовательности или дестабилизации дуплекса происходит формирование дополнительных нуклеазочувствительных сайтов либо усиление расщепления по минорным нуклеазочувствительным сайтам. Тем не менее, при сравнении стабильности немодифицированной *fsiE-4* (полностью деградировала в течение 15 мин) и ее селективно модифицированного аналога *fsiE-4m* (превращался в стабильный более короткий продукт через 15 мин инкубации) (рис. 4), показано, что 2'-О-метильные аналоги нуклеотидов защищают «вилкоподобные» siРНК от действия рибонуклеаз. Мы сравнили характер расщепления смысловых цепей siEm и *fsiE-4m* в присутствии сыворотки (рис. 6). При картировании нуклеазочувствительных сайтов были выявлены три дополнительных сайта расщепления в составе *fsiE-4m*. Один из них располагался, как и ожидалось, в одноцепочечном районе с 3'-конца смысловой цепи дуплекса, тогда как два других (C₆-C₇ и U₅-C₆) соответствовали минорным сайтам расщепления, картированным в siEm. Введение трех 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов в данные сайты позволило получить «вилкоподобную» siРНК, *fsiE-4m+* (Таблица 1), стабильную при инкубации в присутствии сыворотки до 8 ч (рис. 4). Данная siРНК была несколько менее активна по сравнению с *fsiE-4m*: величина IC₅₀ *fsiE-4m+* составила 47 нМ.

Для определения влияния дополнительной модификации в *fsiE-4m+* на продолжительность ее ингибирующего действия было проведено исследование кинетики подавления экспрессии *EGFP/MDR1* (рис. 7 А). Показано, что через 2 суток с момента трансфекции эффективность действия «вилкоподобных» siРНК была сопоставима и составляла порядка 70 % (рис. 7 Б). Активность немодифицированной *fsiE-4* значительно снижалась через 6 суток инкубации, тогда как ингибирующая активность селективно модифицированных аналогов проявлялась до 15 суток. В то же время, активность селективно модифицированной siEm заметно снижалась уже через 8 суток инкубации. Таким образом, комбинация модификации структуры

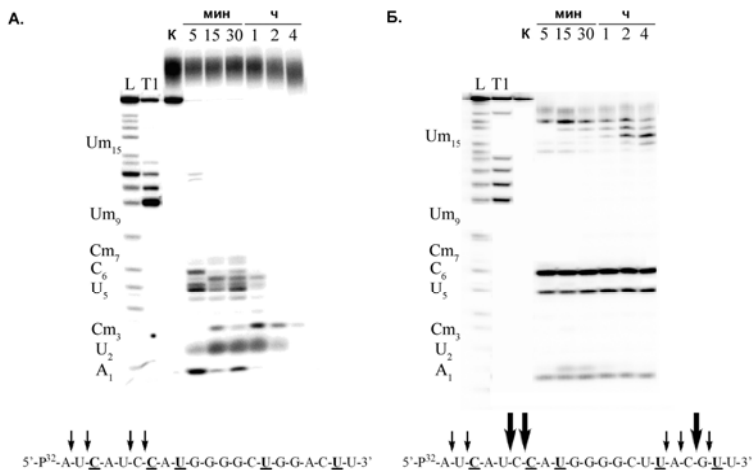


Рис. 6. Картирование нуклеазочувствительных сайтов в siEm (А) и fsiE-4m (Б), содержащих 5'-[³²P]-меченные смысловые цепи. Радиоавтограф 10 % денатурирующего ПААГ. Дорожки L и T1 – имидазольный леддер и леддер РНКазы T1, соответственно; дорожка К – siРНК после инкубации в DMEM без сыворотки. siРНК (3 нМ) инкубировали в DMEM с 10 % FBS при 37°C. Маленькие и большие стрелки указывают на интенсивность расщепления в смысловой цепи siРНК. C и U – 2'-О-метильные аналоги нуклеотидов C и U, соответственно.

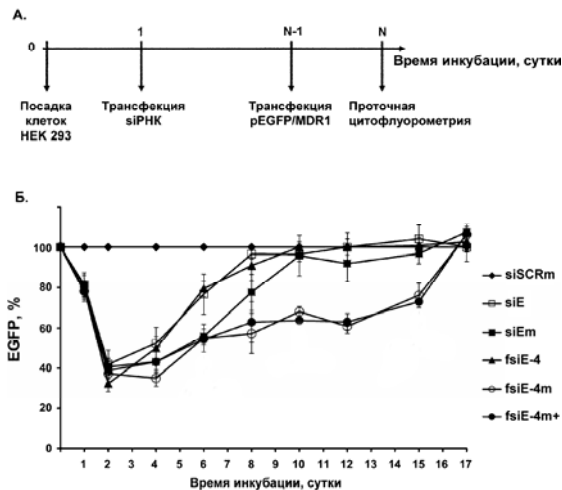


Рис. 7. Длительность подавления экспрессии гена *EGFP/MDR1* селективно модифицированными 2'-О-метильными аналогами «вилкоподобных» siРНК. **А.** Схема эксперимента. Клетки HEK 293 трансфицировали siРНК (100 нМ) и инкубировали (N-1) день (где N: 2 – 17 дней), после чего трансфицировали рекомбинантной плазмидой rEGFP/MDR1. Через N дней инкубации оценивали уровень экспрессии EGFP методом проточной цитофлуорометрии (Б).

дуплекса и химических модификаций позволила получить нуклеазоустойчивые siРНК, способные индуцировать РНК-интерференцию в течение 15 дней после однократной трансфекции, что превышает длительность действия всех синтетических siРНК, описанных в литературе ранее.

2.3 siРНК с дестабилизированной центральной частью дуплекса: биологическая активность

Известно, что активные siРНК обладают низкой термостабильностью дуплекса в районе 9 – 14 н. с 5'-конца антисмысловой цепи. Поэтому введение нуклеотидных замен в центральную часть siРНК, приводящих к образованию неканонических пар или «мисматчей», может способствовать увеличению активности siРНК, однако, с другой стороны, такая модификация может привести к изменению конформационных свойств дуплекса и блокировать РНК-интерференцию. Мы исследовали влияние нуклеотидных замен в составе дуплекса селективно модифицированной siEm на ее интерферирующую активность. Данная siРНК содержит 4 GC-пары в позициях 7 – 10 н. с 5'-конца антисмысловой цепи. В работе использовали ее структурные варианты, содержащие в данном районе 3 или 4 «мисматча» или неканонических GU-пары (Таблица 1), полученных в результате нуклеотидных замен в смысловой или антисмысловой цепи дуплекса. Показано, что введение нуклеотидных замен привело к значительному снижению температуры плавления siРНК (Таблица 1). При исследовании биологической активности обнаружено, что дестабилизация центральной части дуплекса не блокирует интерферирующую активность siРНК (рис. 8).

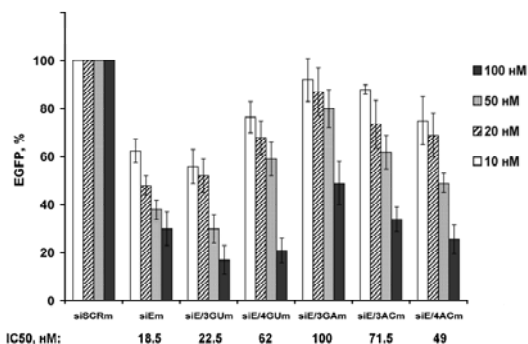


Рис. 8. Интерферирующая активность селективно модифицированных 2'-О-метильных аналогов анти-*MDR1* siРНК с дестабилизированной центральной частью дуплекса. siРНК и рекомбинантную плазмиду рEGFP/*MDR1* ко-трансфицировали в клетки НЕК 293, через 24 ч измеряли уровень сигнала EGFP с помощью проточной цитофлуорометрии.

Более того, активность siРНК с 3 GU-парами превышает активность siРНК «классической» структуры: 90 % подавление экспрессии гена-мишени наблюдалось при использовании ее в концентрации 100 нМ (рис. 8). Аналогичные данные были получены при снижении уровня Р-гликопротеина:

активность siE/3GUm в 2 раза превышала активность siEm. Таким образом, дестабилизация центральной части дуплекса siРНК может способствовать увеличению эффективности ее действия при оптимальном соотношении между конформационными и термодинамическими свойствами дуплекса. Введение неканонических GU-пар в центральную часть дуплекса – это перспективный подход для оптимизации дизайна siРНК.

В ходе проделанной работы мы показали, что применение алгоритма селективной модификации совместно со структурной модификацией позволяет получать нуклеазоустойчивые siРНК длительного действия. Мы предполагаем, что данный подход может быть использован для получения высокоэффективных аналогов siРНК, направленных к любым последовательностям мРНК-мишеней.

3. Липофильные производные анти-*MDR1* siРНК

Для применения siРНК в биомедицинских целях необходимо решить проблему доставки siРНК в клетки. Известно, что ковалентное присоединение к 5'-концу смысловой цепи siРНК липофильных остатков не снижает интерферирующую активность siРНК и способствует увеличению эффективности проникновения их в клетки в отсутствие трансфекционных агентов. Мы исследовали влияние структуры липофильных производных siРНК на эффективность их проникновения в клетки и биологическую активность. В работе использовали серию липофильных производных siDm, направленной к району 557 – 577 н. мРНК гена *MDR1* (рис. 9). Для присоединения к siРНК были выбраны следующие молекулы: холестерин, олеиловый спирт, литохолевая кислота и олеиламид литохолевой кислоты.

3.1 Определение эффективности накопления FITC-меченых липофильных производных siРНК в клетках

Для визуализации накопления липофильных производных siDm в клетках к 3'-концу антисмысловой цепи дуплекса присоединяли остаток флуоресцеинизотиоцианата (Flu). Исследования проводили методом проточной цитофлуорометрии. За эффективность трансфекции siРНК (в %) принимали количество клеток, уровень флуоресценции которых превышал максимальный уровень автофлуоресценции клеток в контроле (необработанные клетки). Чтобы оценить среднюю эффективность накопления siРНК во всей популяции клеток, мы использовали также отношение средних значений интенсивности флуоресценции обработанных и контрольных клеток (RFU). На первом этапе оценивали влияние остатка холестерина в структуре Chol*-siDm-Flu на эффективность его накопления в клетках HEK 293, HepG2, SC1 и KB-8-5. Оказалось, что в отсутствие трансфекционных агентов данная siРНК и ее производное с холестерином практически не проникали в клетки, тогда как при использовании трансфекционных агентов (Липофектамина и Олигофектамина) наличие остатка холестерина повышало эффективность трансфекции только в клетки

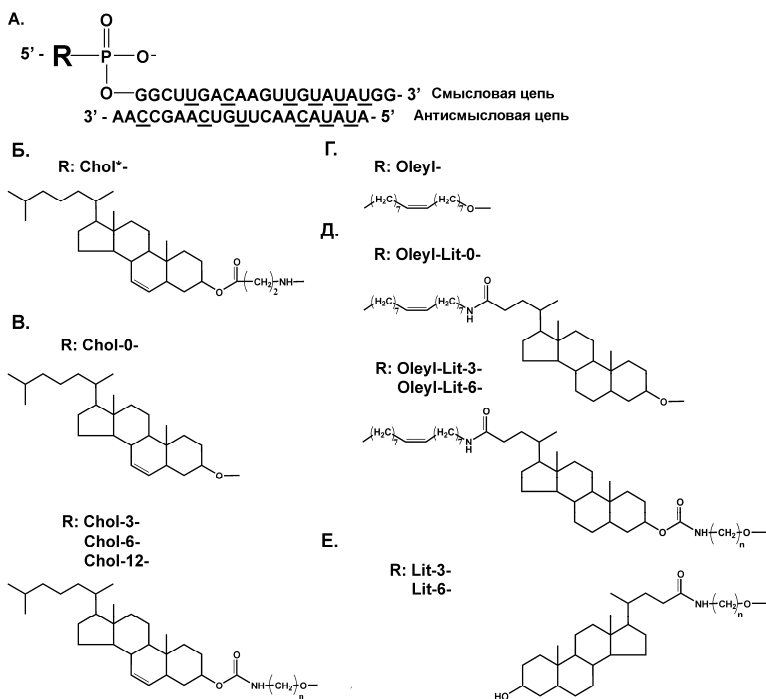


Рис. 9. Структура липофильных производных R-siDm (А), где R – остатки липофильных молекул, введенные с 5'-конца смысловой цепи; U и C – 2'-О-метильные аналоги нуклеотидов U и C, соответственно. **Б.** Остаток холестерина, присоединенный к siРНК через фосфамидную связь. **В. – Е.** Липофильные остатки, присоединенные к siРНК через фосфодиэфирную связь. **В.** Остатки холестерина без аминолинкера и с алифатическим аминолинкером, число метиленовых звеньев (n) составляло: 3, 6, 12. **Г.** Остаток олеилового спирта. **Д.** Остатки олеиламида литохоловой кислоты без аминолинкера и с алифатическим аминолинкером, n = 3, 6. **Е.** Остаток литохоловой кислоты, связанный с алифатическим аминолинкером, n = 3, 6. Модифицированные олигорибонуклеотиды были синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН.

определенных линий (Таблица 2), что, скорее всего, связано с образованием липоплексов оптимального размера и формы за счет участия холестерина во взаимодействии между олигонуклеотидом и трансфекционным агентом. Мы предполагаем, что необходимость оптимизации структуры комплекса siРНК / трансфекционный агент в каждом конкретном случае связана с зависимостью эффективности трансфекции от свойств клеточной мембраны. Таким образом, введение остатка холестерина в состав siРНК является перспективным подходом, позволяющим увеличить эффективность

Таблица 2. Накопление siDm-Flu и Chol*-siDm-Flu в клетках различных типов

Клетки	Условия			% ²⁾	RFU ³⁾
	Трансфектант	Концентрация siРНК, нМ	Chol ¹⁾		
НЕК 293	Липофектамин	50	+	35	15.1
			-	21	7.6
SC1	Липофектамин	50	+	35	1.4
			-	27	1.3
КВ-8-5	Олигофектамин	50	+	29	5.0
			-	20	4.0
		100	+	52	13.6
			-	29	6.0
		200	+	81	18.9
			-	57	8.6

¹⁾ “+”/“-” – наличие/отсутствие остатка холестерина в составе siРНК.

²⁾ Эффективность трансфекции (%). Величина стандартного отклонения ≤ 10 %.

³⁾ Отношение среднего значения интенсивности флуоресценции всей популяции клеток, обработанной siРНК, к среднему значению интенсивности флуоресценции контрольной популяции клеток.

трансфекции siРНК в клетки в комплексе с трансфекционными агентами.

На втором этапе мы исследовали влияние длины линкера, а также типа липофильного остатка на эффективность проникновения производных серии R-siDm (рис. 9 А, В, Г, Д, Е), при этом диапазон исследуемых концентраций был увеличен. С помощью метода проточной цитофлуорометрии мы сравнили эффективность накопления липофильных производных siРНК в клетках НЕК 293, НерG2 и КВ-8-5. Обнаружено, что холестерин-модифицированные siРНК, а также производные siРНК, содержащие остаток олеиламида литохолевой кислоты, способны эффективно накапливаться в клетках всех типов в отсутствие трансфекционных агентов (рис. 10), при этом эффективность накопления липофильных производных зависит от типа клеток. В свою очередь, немодифицированная siРНК, а также производные с литохолевой кислотой и олеиловым спиртом не проникали в клетки. Кроме того, в ходе исследования была выявлена тенденция увеличения эффективности трансфекции от длины линкера, соединяющего остаток липофильной молекулы с siРНК (рис. 10). Сравнение средних значений

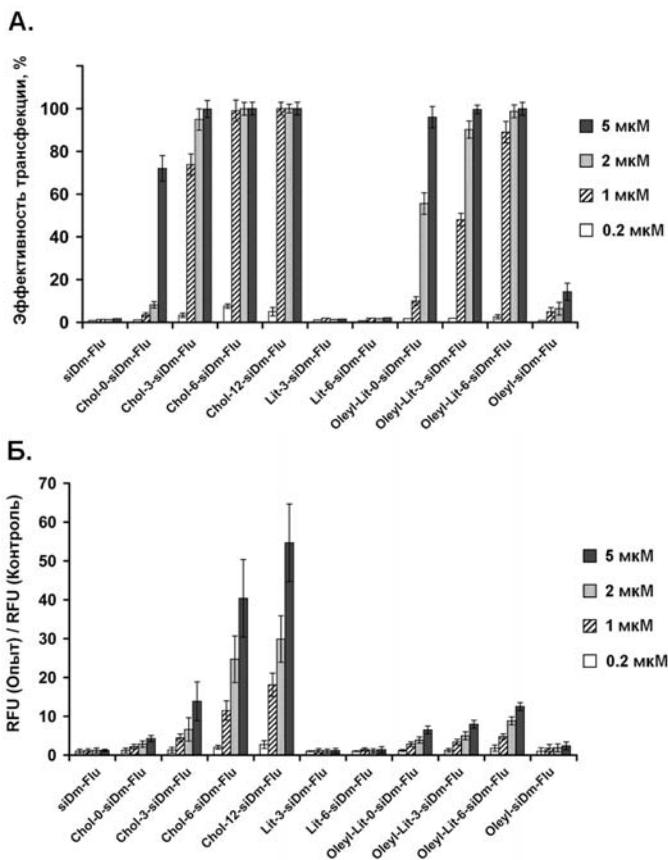


Рис. 10. Эффективность накопления FITC-меченых липофильных производных siРНК R-siDm-Flu в клетках KB-8-5 в среде без сыворотки. **А.** Эффективность трансфекции (%). **Б.** Соотношение среднего уровня флуоресценции (RFU) популяции клеток в образце, обработанном производным siРНК, к среднему уровню автофлуоресценции клеток в необработанном контроле.

интенсивности флуоресценции клеток показало, что производные siРНК и холестерина, связанные аминоксильным и аминоксидодецильным линкерами, лучше всех накапливаются в клетках (рис. 10 Б). Точный механизм проникновения липофильных производных siРНК в клетки неизвестен, поэтому мы предположили, что длинный алифатический линкер (гексильный или додецильный) в их структуре может обеспечивать оптимальную дистанцию между клеточной мембраной и полианионом siРНК, а также увеличивать гидрофобность. Таким образом, введение остатков молекул

липофильной природы, в частности, холестерина, в состав siРНК может быть эффективно использовано для оптимизации их дизайна.

Исследование локализации холестерин-содержащих siРНК в клетках KB-8-5 с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии проводили через период времени, соответствующий уровню максимального накопления производных в клетках (8 ч). Мы подтвердили, что холестерин-содержащие siРНК действительно проникают в клетки без использования трансфекционных агентов. При этом наблюдается дисперсное распределение производных в цитоплазме, которое достигает наибольшей плотности с наружной стороны ядра (рис. 11).

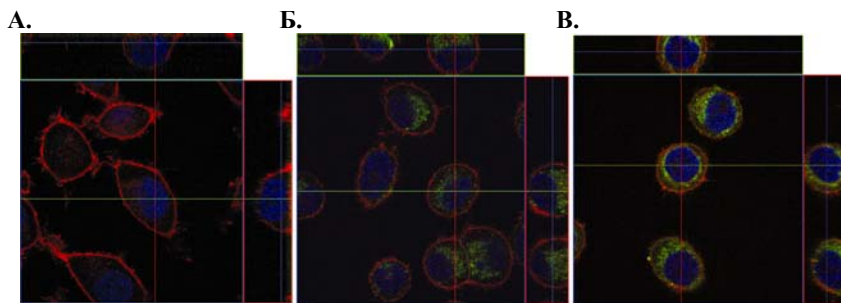


Рис. 11. Локализация siРНК (2 мкМ) в клетках KB-8-5 через 8 ч инкубации. Ортогональные проекции, полученные при сканировании препаратов клеток, обработанных siDm-Flu (А), Chol-6-siDm-Flu (Б) и Chol-12-siDm-Flu (В), с помощью конфокального микроскопа. Наложение трех изображений: зеленый фильтр (FITC-меченые siРНК); синий фильтр (окрашивание ядер с помощью DAPI); красный фильтр (окрашивание актиновых филаментов с помощью Родамина-Фаллоидина).

3.2 Исследование биологической активности липофильных производных siРНК

Влияние липофильных остатков в составе siРНК на их интерферирующую активность оценивали на лекарственно-устойчивой линии клеток KB-8-5, способных расти в присутствии винбластина (300 нМ). С помощью МТТ-теста было показано, что при трансфекции Chol*-siDm (20 – 200 нМ) в комплексе с Олигофектамином эффективность действия siРНК в 1.3 – 1.4 раза превышала активность siDm, что согласуется с результатами, полученными при оценке эффективности накопления siРНК в клетках (Таблица 2). При исследовании биологической активности холестерин-содержащих анти-*MDR1* siРНК без использования трансфекционных агентов было обнаружено, что эффективность подавления экспрессии Р-гликопротеина увеличивается при увеличении длины алифатического аминоклипера от 0 до 6 углеродных атомов (рис. 12), что коррелирует с данными по накоплению (рис. 10). Максимальный уровень подавления синтеза Р-гликопротеина в клетках (до 30 %) Chol-6-siDm наблюдался через 5

суток инкубации. Следует отметить, что при использовании трансфектанта 35 % уровень Р-гликопротеина наблюдался уже через 3 дня с момента трансфекции siDm (рис. 12). Мы предполагаем, что причиной задержки проявления биологической активности может быть неэффективное высвобождение липофильных производных из эндосом. В пользу этого говорит тот факт, что Chol-12-siDm, которая наиболее эффективно накапливалась в клетках, была менее активна по сравнению с Chol-3-siDm и Chol-6-siDm. Таким образом, при оптимизации структуры липофильных производных siРНК установление баланса между длиной аминокислотного остатка, эффективностью проникновения и биологической активностью является принципиально важным.

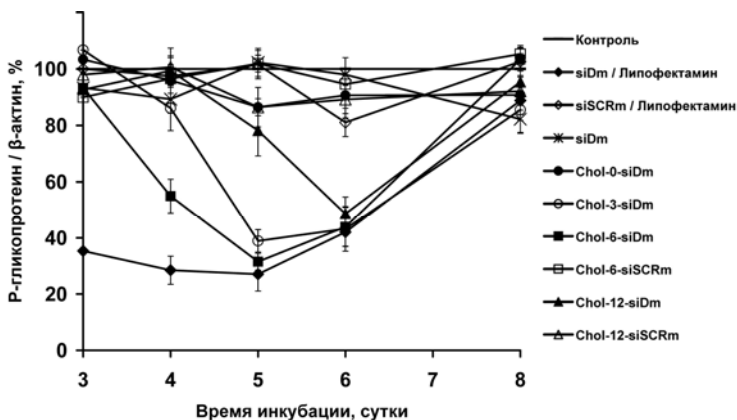


Рис. 12. Кинетика подавления синтеза Р-гликопротеина в клетках KB-8-5 холестеринowymi производными анти-*MDR1* siРНК (5 мкМ) и siDm (0.1 мкМ) в комплексе с Липофектамином. Данные получены методом Вестерн блота с последующим количественным анализом уровня белка. β -Актин был использован в качестве внутреннего стандарта. Необработанные клетки были использованы в качестве контроля.

Способность холестерин-содержащих siРНК обращать фенотип МЛУ (множественной лекарственной устойчивости) клеток KB-8-5 была исследована методом МТТ-теста через 4 – 6 дней инкубации в присутствии 300 нМ винбластина. Было показано, что максимальный эффект для всех производных наблюдается через 6 суток инкубации (рис. 13), что согласуется с результатами, полученными при исследовании кинетики подавления синтеза Р-гликопротеина (рис. 12). Chol-6-siDm обладает максимальной способностью восстанавливать чувствительность раковых клеток к цитостатику, снижая количество живых клеток до 45 %. При этом наличие остатка холестерина в составе siРНК не увеличивает ее токсичность (рис. 13).

Таким образом, путем варьирования типа липофильного остатка и длины линкера, связывающего его с siРНК, нам удалось оптимизировать структуру липофильных производных siРНК. Анти-*MDR1* siРНК, в состав которой с помощью аминокислотного линкера был введен остаток холестерина, эффективно проникала в раковые клетки, восстанавливала уровень Р-гликопротеина и обращала фенотип лекарственной устойчивости данных клеток. На основании полученных данных можно сделать вывод, что холестерин-содержащие siРНК являются перспективными агентами для создания на их основе лекарственных препаратов.

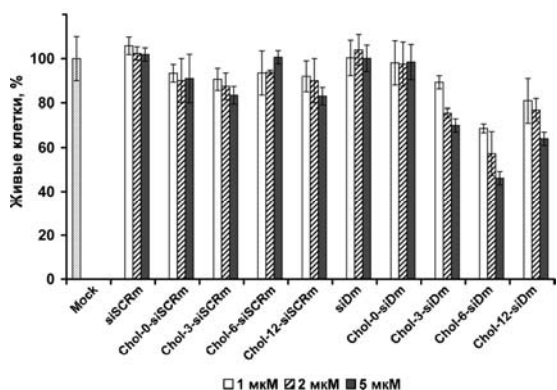


Рис. 13. Количество живых клеток KB-8-5 в присутствии 300 нМ винбластина по данным МТТ-теста, проведенного через 6 суток после обработки siРНК (1 – 5 мкМ) без использования трансфекционных агентов. Mock – необработанные клетки.

Выводы

Исследованы способы оптимизации структуры малых интерферирующих РНК (siРНК), направленных к мРНК гена *MDR1*, за счет введения в их состав 2'-О-метильных аналогов нуклеотидов, остатков липофильных молекул, а также нуклеотидных замен, приводящих к образованию неканонических пар или неспаренных оснований.

1. Показано, что 2'-О-метильные аналоги нуклеотидов, расположенные в нуклеазочувствительных сайтах дуплекса siРНК, не изменяют ее интерферирующую активность, защищают от деградации нуклеазами эмбриональной бычьей сыворотки и увеличивают длительность ингибирования экспрессии гена-мишени по сравнению с немодифицированной siРНК такой же последовательности с 4 до 6 дней.

2. Исследовано влияние количества и расположения нуклеотидных замен в составе селективно модифицированных siРНК на их интерферирующую активность, нуклеазоустойчивость и длительность ингибирующего действия и показано, что:

- замена четырех нуклеотидов на 3'-конце смысловой цепи siРНК, приводящая к образованию «мисматчей», увеличивает эффективность подавления экспрессии гена-мишени до 3 раз и снижает уровень Р-гликопротеина (продукта гена *MDR1*) до 1.8 раза;

- введение трех нуклеотидных замен в центральную часть дуплекса, приводящее к образованию GU-пар, способствует двукратному увеличению эффективности подавления экспрессии гена-мишени и снижению уровня Р-гликопротеина;

- селективная модификация нуклеозочувствительных сайтов в составе siРНК, имеющих структуру «вилки», существенно увеличивает длительность их ингибирующего действия, что позволило впервые получить siРНК, способные снижать экспрессию гена-мишени в клетках в течение 15 суток после однократной трансфекции.

3. Выполнен анализ способности липофильных производных селективно модифицированных siРНК проникать в клетки без использования трансфектанта и подавлять экспрессию гена *MDR1*. Показано, что:

- эффективность накопления липофильных производных siРНК в клетках уменьшается в зависимости от типа липофильной молекулы в ряду холестерин > олеиламид литохолевой кислоты > литохолевая кислота ≥ олеиловый спирт и значительно увеличивается при удлинении алифатического линкера между siРНК и липофильным остатком от 0 до 12 атомов углерода;

- холестерин-содержащая siРНК с аминоксильным линкером эффективно проникает в клетки без использования трансфектанта, ингибирует экспрессию гена-мишени, снижая количество Р-гликопротеина на 4 – 6 сутки инкубации в 2 – 3 раза, и восстанавливает чувствительность раковых клеток к ранее переносимой концентрации цитостатика.

Результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Круглова Н. С., Мещанинова М. И., Веньямина А. Г., Власов В. В., Черноловская Е. Л. 2'-О-Метильные аналоги одноцепочечных и двуцепочечных малых интерферирующих РНК: нуклеазоустойчивость и биологическая активность // *Фундаментальные науки – медицине: сб. трудов конференций.* – Новосибирск: Арта. – 2008. – С. 129-133.
2. Volkov A. A., Kruglova N. S., Meschaninova M. I., Venyaminova A. G., Zenkova M. A., Vlassov V. V., Chernolovskaya E. L. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect // *Oligonucleotides.* – 2009. – V. 19. – P. 191-202.
3. Круглова Н. С., Мещанинова М. И., Веньямина А. Г., Зенкова М. А., Власов В. В., Черноловская Е. Л. Холестерин-модифицированные малые интерферирующие РНК, направленные на мРНК гена *MDR1*: внутриклеточная доставка и биологическая активность // *Молекулярная биология.* – 2010. – Т. 44. – С. 284-293.
4. Petrova (Kruglova) N. S., Meschaninova M. I., Venyaminova A. G., Zenkova M. A., Vlassov V. V., Chernolovskaya E. L. 2'-O-methyl modified anti-*MDR1* fork-siRNA duplexes exhibiting high nuclease resistance and prolonged silencing activity // *Oligonucleotides.* – 2010. – V. 20. – P. 297-308.