

*На правах рукописи*

ДАВЫДОВА АННА СЕРГЕЕВНА

**НОВЫЕ МОНО- И БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА  
ОСНОВЕ 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ ДЛЯ  
ДЕТЕКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА**

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Научный руководитель:**

**Воробьева Мария Александровна**, к.х.н.

**Официальные оппоненты:**

**Жарков Дмитрий Олегович**, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», зав. лабораторией.

**Копылов Алексей Михайлович**, д.х.н., кафедра химии природных соединений химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, профессор.

**Шестопалов Михаил Александрович**, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт неорганической химии им. А. В. Николаева СО РАН, зав. лабораторией.

Защита состоится 2 июля 2021 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, пр. 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](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент

Коваль В. В.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Аптамеры на основе нуклеиновых кислот представляют собой относительно короткие одноцепочечные фрагменты ДНК и РНК, способные узнавать заданные молекулы-мишени за счет формирования уникальной пространственной структуры. По аффинности и специфичности связывания с мишенью аптамеры являются наиболее близкими аналогами моноклональных антител. При этом возможность воспроизводимого и масштабируемого химического синтеза НК-аптамеров, их устойчивость при хранении и транспортировке, а также толерантность к введению химических модификаций обеспечили их применение для решения молекулярно-биологических, биомедицинских и биотехнологических задач.

Аптамеры являются универсальными «строительными блоками» для создания многокомпонентных конструкций. Комбинируя аптамерные модули, можно получать молекулы с необходимым набором свойств. Так, например, мультивалентные аптамеры могут включать в себя несколько копий одной и той же нуклеотидной последовательности для многоцентрового связывания молекул-мишеней. С другой стороны, соединение в одной конструкции аптамеров к разным мишеням позволяет получить молекулу, обладающую сочетанием функциональных характеристик. Уникальные возможности, которые дает использование аптамеров в качестве молекулярных узнающих элементов, обеспечили стойкий интерес исследователей в этой области синтетической химии нуклеиновых кислот.

В рамках данной работы была исследована возможность создания новых систем детекции на основе аптамеров для количественного определения белковых биомаркеров на примере суммарного и гликированного гемоглобинов. Гликированный гемоглобин HbA1c является одним из основных биомаркеров сахарного диабета. Его относительное содержание в суммарном гемоглобине крови позволяет оценить средний уровень гликемии за прошедшие 6-8 недель и может быть использовано для ранней диагностики заболевания. В текущей клинической практике для определения уровня гликированного гемоглобина используют аффинную хроматографию, иммуноферментный анализ и масс-спектрометрию, однако каждый из этих методов имеет определенные недостатки. Создание доступных и надежных способов детекции биомаркеров сахарного диабета остается актуальной задачей. На данный момент в литературе описано несколько вариантов биосенсоров на основе ДНК-аптамеров (аптасенсоров) для количественного определения гликированного гемоглобина. В данной работе мы предложили создание новых оптических систем детекции, которые отличаются простотой и доступностью проведения анализа при достаточно высокой чувствительности, а также совместимы с микропланшетным форматом анализа. В качестве узнающих элементов аптасенсоров мы выбрали устойчивые в биологических средах 2'-F-пиримидин-модифицированные РНК-аптамеры.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы является получение новых моно- и бифункциональных конструкций на основе 2'-F—пиримидин-модифицированных РНК-аптамеров и исследование возможности создания на их основе систем для оптической детекции белковых биомаркеров на примере суммарного и гликированного гемоглобинов.

Для этого необходимо решить следующие задачи:

- провести селекцию 2'-F-РНК-аптамеров<sup>1</sup>, связывающихся с суммарным и/или гликированным гемоглобином; оптимизировать их нуклеотидные последовательности, определить аффинность к белковым мишеням и селективность связывания;
- сконструировать на основе гемоглобин-специфичных 2'-F-РНК-аптамеров системы детекции с колориметрическим и биолюминесцентным типом сигнала и исследовать их свойства;
- провести селекцию 2'-F-РНК-аптамеров, узнающих фотопротеин обелин; оптимизировать их нуклеотидные последовательности, определить аффинность к белку-мишени;
- сконструировать бифункциональные аптамеры, в которых модули, связывающие белок-аналит и репортерный белок обелин, объединены в одну молекулу, и показать принципиальную возможность создания на их основе системы биолюминесцентной детекции гемоглобина.

**Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.** В рамках данной диссертационной работы впервые получены 2'-F-РНК аптамеры, способные связывать суммарный и гликированный гемоглобин человека. Проведена оптимизация их нуклеотидной последовательности, с использованием комплекса биофизических методов анализа показано формирование квадруплексных структур в составе G-богатых аптамеров. Сконструирована система гетерофазной колориметрической детекции гемоглобина с помощью полученных аптамеров с прямой иммобилизацией аналита, а также в сэндвич-формате в сочетании с гемоглобин-специфичными поликлональными антителами. Разработана система биолюминесцентной детекции гемоглобина в гетерофазном варианте с использованием конъюгатов  $\text{Ca}^{2+}$  зависимого фотопротеина обелина с антителами. Показана принципиальная возможность селективной биолюминесцентной детекции гликированного гемоглобина в присутствии суммарного гемоглобина.

Предложена новая стратегия создания систем для биолюминесцентной детекции с нековалентной иммобилизацией фотопротеина обелина через специфичный к нему аптамер. Впервые получены 2'-F-РНК аптамеры, узнающие фотопротеин обелин, проведена оптимизация их нуклеотидной

---

<sup>1</sup> Здесь и далее под 2'-F-РНК-аптамерами подразумеваются РНК-аптамеры, в составе которых все пиримидиновые нуклеотиды заменены на их 2'-F-аналоги.

последовательности с сохранением аффинности к белковой мишени. Создана серия бифункциональных аптамеров с переключаемой активностью, состоящих из гемоглобин-связывающего и обелин-связывающего модулей. Показана принципиальная возможность биоломинесцентной детекции суммарного гемоглобина в растворе с использованием бифункциональных конструкций. Полученные данные позволяют рассматривать предложенный подход к конструированию аптасенсоров в качестве принципиально нового метода детекции белковых биомаркеров.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Созданы 2'-F-РНК-аптамеры, способные связывать суммарный гемоглобин человека либо только гликированный гемоглобин, а также 2'-F-РНК-аптамеры к фотопротеину обелину. Оптимизированы нуклеотидные последовательности аптамеров, охарактеризована их аффинность к соответствующим белковым мишеням.

2. С использованием комплекса биофизических методов анализа показано, что наиболее вероятной структурой в составе 2'-F-РНК-аптамеров к суммарному гемоглобину является G-квадруплекс с параллельной топологией.

3. Показана возможность использования полученных аптамеров для биоломинесцентной детекции суммарного и гликированного гемоглобина, в том числе в составе смеси белков. Показана возможность использования аптамера H9t1 для колориметрической детекции суммарного гемоглобина как в системе с прямой иммобилизацией анализируемого белка, так и в сэндвич-формате с применением специфических антител.

4. Создана серия бифункциональных конструкций, в которых гемоглобин-связывающий и обелин-связывающий аптамеры объединены в одну молекулу с переключаемой активностью. Показана возможность их использования для микропланшетной биоломинесцентной детекции гемоглобина человека.

**Апробация и публикации результатов.** По результатам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Основные результаты были представлены на российских и международных конференциях: II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (18-23 июня 2017 г., Новосибирск, Россия); Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (24-26 июля 2017 г., Новосибирск, Россия); 7th Cambridge Symposium «Nucleic Acids Chemistry and Biology» (Cambridge, UK, 3-6 September 2017); 43rd FEBS Congress «Biochemistry forever» (6-13 July, 2018, Prague, Czech Republic); Международная конференция «Aptamers in Russia 2019» (27-30 августа 2019 г., Красноярск, Россия).

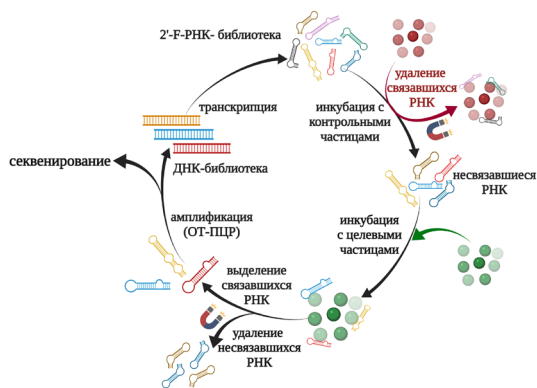
**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и

списка литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 45 рисунков, 14 таблиц и 3 приложения. Библиография включает 200 литературных источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Получение 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих суммарный и гликированный гемоглобин человека

Для получения методом SELEX (рис. 1) аптамеров, связывающих разные варианты гемоглобина человека, была использована 87-звенная комбинаторная 2'-F-РНК-библиотека, содержащая 40-нуклеотидный рандомизированный участок. В качестве мишени для отбора были использованы коммерческие препараты суммарного или гликированного (HbA1c) гемоглобинов из крови человека, ковалентно присоединенные к магнитным частицам. Иммунизация белков-мишеней позволила отделять несвязавшиеся молекулы РНК в ходе селекции при промывке частиц соответствующим буферным раствором.



**Рисунок 1.** Принципиальная схема *in vitro* селекции 2'-F-РНК-аптамеров на Hb и HbA1c. В качестве мишеней для негативной селекции использовали «пустые» или ЧСА-модифицированные магнитные частицы (селекция на Hb), или Hb-модифицированные магнитные частицы (селекция на HbA1c).

Для повышения селективности отбора с 7-го по 10-й раунды отбора на суммарный гемоглобин была использована негативная селекция на человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), иммобилизованный на магнитных частицах. Для получения более селективных аптамеров, способных различать два варианта гемоглобина, в ходе отбора на гликированный гемоглобин HbA1c с 8-го по 12-й раунды в качестве мишени для негативной селекции были использованы гемоглобин-содержащие магнитные частицы. Для получения 2'-F-РНК-аптамеров было проведено 10 раундов отбора на суммарный гемоглобин и 12 раундов – на гликированный гемоглобин HbA1c.

### 2. Анализ нуклеотидных последовательностей индивидуальных аптамеров и их минимизация

Исходные и обогащенные библиотеки после 4-го, 8-го и 10-го раундов селекции на суммарный гемоглобин и 4-го, 7-го, 11-го и 12-го раундов отбора на гликированный гемоглобин были переведены в форму дцДНК для

высокопроизводительного секвенирования. Полученные после биоинформатического анализа нуклеотидные последовательности индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров были упорядочены в соответствии с их представленностью в конечных обогащенных библиотеках.

После 10 раундов селекции на суммарный гемоглобин 25.5 % всех последовательностей составлял аптамер Н1, при этом его доля в библиотеке последовательно увеличивалась в ходе селекции (табл. 1). Анализ нуклеотидных последовательностей индивидуальных аптамеров выявил наличие нескольких G-богатых участков. Дополнительный анализ наиболее вероятных вторичных структур с помощью алгоритма VIENNA RNAfold показал теоретическую возможность формирования G-квадруплексов (G4) в составе аптамеров Н5, Н7, Н1536 и Н9.

**Таблица 1.** Наиболее часто встречающиеся нуклеотидные последовательности после селекции 2'-F-РНК-аптамеров на суммарный гемоглобин.

аптамер	нуклеотидная последовательность рандомизированного участка, 5'-3'	частота встречаемости, %		
		4 раунд	8 раунд	10 раунд
Н1	UGGCGCCACCUAAUGCUCAGUACUUAUUUA UGGCGAACCA	9.6	17.1	25.5
Н2	AGAGAAUUGGGGCUUCCUGCCCAAGUAUAC CAUGA	14.2	11.7	8.9
Н5	CCGAGGGAGGGGGGAGGAUGGCUGUGCGU UUUACUUCUU	0.0	3.4	3.2
Н870	AGAGAAUUGGGGCUUCCUGCCCAAGUAUAC CAUUUUUUGA	5.2	3.3	2.4
Н3	GGGAGCCUUGGCAGUCGACCUAGACUCAGA UUUAAAAGUU	6.8	4.7	2.2
Н7	GUGAGACCUCGUAGUUGCGGGGAAGCGGA GGGAGGGUAG	0.0	3.2	2.1
Н4	GAGCGGCACCUAUACCAGUACUUUAUGUU UUGCCCGCAU	0.2	4.5	1.9
Н18	UUGUCAGCCC GGUCGACCUAGAAUUCCAA UUUGACAUU	0.0	0.1	1.5
Н1536	GGGGGGGUCUUGUGAGUUAGGGUUAGGGCC GAGCGUGC AU	0.0	1.4	1.5
Н9	UAGUACCUAGUACGCCUGGCAGUCGCGGGG AGGGGGGGAGGAG	0.0	1.2	1.4
Н17	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGAG CAAUCCGCUU	0.0	0.2	1.3
Н6	AGGGUGCCGCCUAACACUCUAAUUUAUUGA UCGGCAUACC	13.3	4.6	1.3

Анализ обогащенных библиотек после селекции на гликированный гемоглобин НbА1с выявил 4 лидирующих по частоте встречаемости последовательности 2'-F-РНК: gН1 (22.5 %), gН2 (10.2 %) и отличающуюся от нее одним нуклеотидом gН10 (6.8 %) и gН4 (6.1 %) (табл. 2). После анализа предполагаемых вторичных

структур этих РНК не было найдено фрагментов, способных формировать G4-структуры в их составе. Было показано, что нуклеотидная последовательность аптамера gH8 также присутствует среди частотных лидеров библиотеки после селекции на суммарный гемоглобин (H1536, 1.5 % после 10 раундов). Для дальнейшего анализа свойств были выбраны наиболее часто встречающиеся аптамеры H1 и gH1, gH2, gH4. Кроме того, были выбраны потенциально G4-формирующие последовательности H5 и H9, частота встречаемости которых увеличивалась в ходе отбора, а также аптамер gH8, представленный в обогащенных библиотеках после селекции на оба варианта гемоглобина.

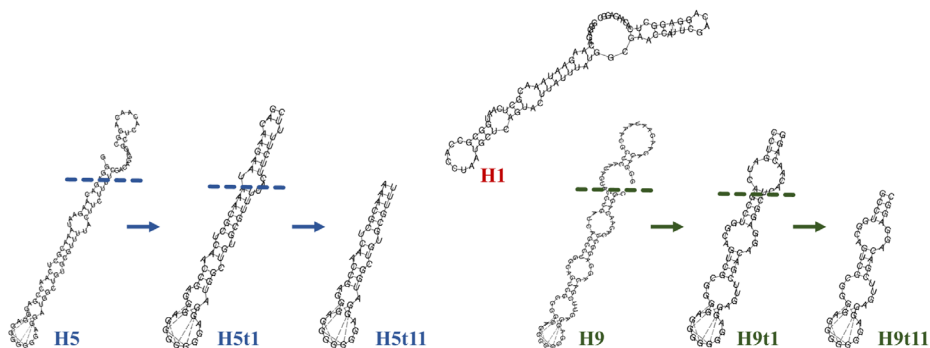
**Таблица 2.** Наиболее часто встречающиеся нуклеотидные последовательности после селекции на гликированный гемоглобин HbA1c.

аптамер	нуклеотидная последовательность рандомизированного участка, 5'-3'	частота встречаемости, %			
		4 раунд	7 раунд	11 раунд	12 раунд
gH1	UGGGGAUUCUGUAGUGGGGAAGGGCCGAGCGUACAA GCC	0.1	5.6	18.0	22.5
gH2	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAGGAGCAA UCGCCUG	0.3	4.8	10.9	10.2
gH10	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGCGCAAAU CGCCUG	0.0	0.1	4.3	6.8
gH4	CUAGAAGGGGCAAUCGUAGGGGACGCUAGUGAGAC GGUUA	0.3	0.7	4.8	6.1
gH6	AUCGAAAUAGCAAGAACCUGUCGAGCACCCUGCUA CAUAC	0.0	0.1	6.5	5.9
gH7	AGGGGAUUCUGUAGUGGGAGGGCCGAGCGUACAAG CC	0.0	0.6	4.4	5.5
gH1124	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGAGCAA UCGCCUG	5.0	18.0	6.6	4.7
gH20	UGUACGAAAUAGCUGCCUGAUUGUCC	0.0	0.0	3.5	3.9
gH12	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAAGAGCGAA UCGCCUG	0.0	0.9	3.3	3.3
gH3391	GGGGUUCUUGGUAAGUGGGAGGGCCAGGAGCAA ACGCCUG	0.0	0.5	2.4	2.8
gH8	GGGGGGGUCUUGUGAGUUAGGGUUAGGGCCGAGC GUGCUAU	4.3	8.1	4.7	2.7
gH11	UCGAAAUAGCAGCAAUCUCAAGAGCCAAACUAUAU GAUAG	0.0	0.0	2.9	2.2
gH24	UGGGGAUUCUGUAGUGGGAGGGCCGAGCAUACACC AAGCC	1.9	14.5	3.0	1.9

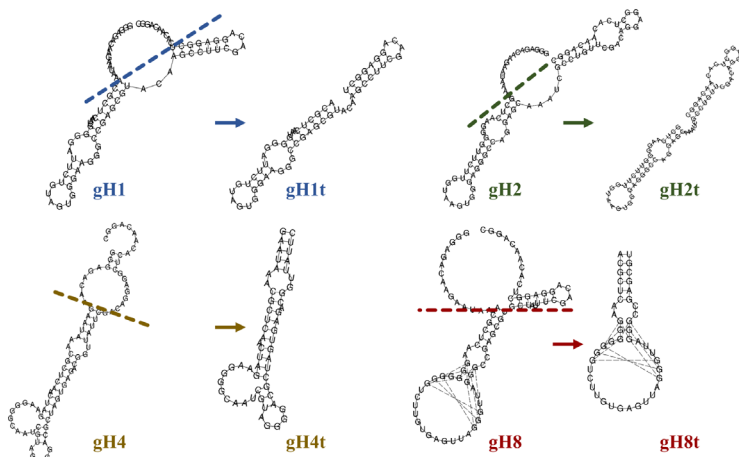
На основании анализа предполагаемых вторичных структур полноразмерных 87-звенных последовательностей были предложены варианты укорочения кандидатных аптамеров. В случае аптамера H1 оба константных участка вовлечены в формирование вторичной структуры через комплементарные



взаимодействия с нуклеотидами центральной области. Потенциально их удаление может привести к дестабилизации пространственной структуры аптамера, необходимой для связывания белка-мишени. С учетом этого для дальнейшего анализа была использована полноразмерная версия аптамера H1. В случае аптамеров H5 и H9 один из константных участков по данным Vienna RNAfold имеет собственную вторичную структуру с довольно низкой стабильностью и не взаимодействует с нуклеотидами центральной области.



**Рисунок 2.** Предполагаемые вторичные структуры полноразмерных и укороченных вариантов 2'-F-РНК-аптамеров к суммарному гемоглобину по данным VIENNA RNAfold. Пунктирными линиями соединены остатки гуанозина, формирующие G-квадруплексы. Цветными линиями обозначены границы, в пределах которых удаляли нуклеотиды в составе аптамеров.



**Рисунок 3.** Предполагаемые вторичные структуры полноразмерных и укороченных вариантов 2'-F-РНК-аптамеров к гликированному гемоглобину по данным VIENNA RNAfold. Пунктирными линиями соединены остатки гуанозина, формирующие

G-квадруплексы. Цветными линиями обозначены границы, в пределах которых удаляли нуклеотиды в составе аптамеров.

Анализ предполагаемых вторичных структур наиболее часто встречающихся последовательностей 2'-F-РНК, отобранных по родству к гликированному гемоглобину HbA1c, выявил наличие протяженных неструктурированных одноцепочечных 5'- и/или 3'-концевых участков для аптамеров gH1, gH2 и gH8. В случае аптамера gH4 5'- и 3'-константные фрагменты не участвовали в формировании элементов вторичной структуры центральной области, образуя дуплекс из 3-х пар нуклеотидов между собой. Удаление концевых фрагментов не оказывало существенного влияния на предполагаемые вторичные структуры данных аптамеров (рис. 3).

### 3. Исследование аффинности аптамеров к суммарному и гликированному гемоглобинам

Для определения аффинности индивидуальных аптамеров к белковым мишеням был использован метод гетерофазного биолюминесцентного анализа в сэндвич-формате. В качестве репортерной молекулы был использован  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый фотопротейн обелин, обеспечивающий высокую чувствительность детекции. Ранее в совместных работах лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН и лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН была показана хорошая совместимость такого формата анализа с парами аптамер/антитело и аптамер/аптамер в качестве узнающих элементов. (Krasitskaya, V. V. et al. *Anal. Chim. Acta*, 2019, 1064, 112–118; Vorobjeva, M.A. et al. *Anal. Chem.*, 2014, 86, 2590–2594). В ходе анализа биотин-содержащий аптамер был иммобилизован в лунках микропланшета, покрытых стрептавидином. После добавления гемоглобина (Hb или HbA1c) комплексы аптамера с мишенью визуализировали с помощью гемоглобин-специфичных антител, конъюгированных с обелином. Биолюминесценцию обелина инициировали добавлением раствора  $\text{CaCl}_2$  (рис. 4).



**Рисунок 4.** Схема билюминесцентного гетерофазного анализа связывания индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров с белковыми мишенями (Hb или HbA1c).

Уровень биолюминесцентного сигнала в случае аптамера H1 практически не превышал значений для контрольных образцов, не содержавших аптамер. Наибольшее плато значение интенсивности биолюминесцентного сигнала наблюдалось для аптамера H9t1, при связывании аптамера H5t1 уровень сигнала снижался примерно в два раза. Рассчитанные из полученных данных значения  $K_d$

комплексов аптамер-мишень составили 280 и 290 нМ для аптамеров H5t1 и H9t1, соответственно. Также было показано, что эти аптамеры обладают примерно одинаковым сродством к суммарному и гликированному гемоглобинам (табл. 3). В перспективе это позволяет использовать аптамеры H5t1 и H9t1 в качестве универсальных узнающих элементов для детекции обоих вариантов гемоглобина человека.

**Таблица 3.** Значения  $K_d$  для комплексов 2'-F-РНК-аптамеров с Hb и HbA1c.

аптамер	биолюминесцентный анализ		колориметрический анализ
	Hb	HbA1c	Hb
H1	нет связывания	не определяли	не определяли
H5t1	280±50 нМ	430±100 нМ	141±11 нМ
H9t1	290±70 нМ	380±90 нМ	117±19 нМ
gH1t	нет связывания	250±80 нМ	не определяли
gH2t	не определяли	нет связывания	не определяли
gH4t	не определяли	нет связывания	не определяли
gH8t	190±20 нМ	110±40 нМ	87±20 нМ

При анализе сродства аптамеров gH1t, gH2t, gH4t и gH8t к гликированному гемоглобину образование комплекса с мишенью было показано для наиболее представленного в финальной библиотеке аптамера gH1t, а также для аптамера gH8t, который был также получен независимо при селекции на суммарный гемоглобин (табл. 3). Для аптамеров gH2t и gH4t уровни биолюминесцентного сигнала практически не отличались от фоновых значений. В случае суммарного гемоглобина образование комплекса с мишенью для аптамеров этой серии было выявлено только для gH8t. Судя по полученным значениям  $K_d$ , для этого аптамера характерно примерно одинаковое сродство к обоим вариантам гемоглобина (табл. 3). На основании данных о кросс-селективности связывания с нормальным и гликированным гемоглобинами можно рассматривать аптамер gH1t в качестве селективного узнающего элемента для детекции гликированного гемоглобина.

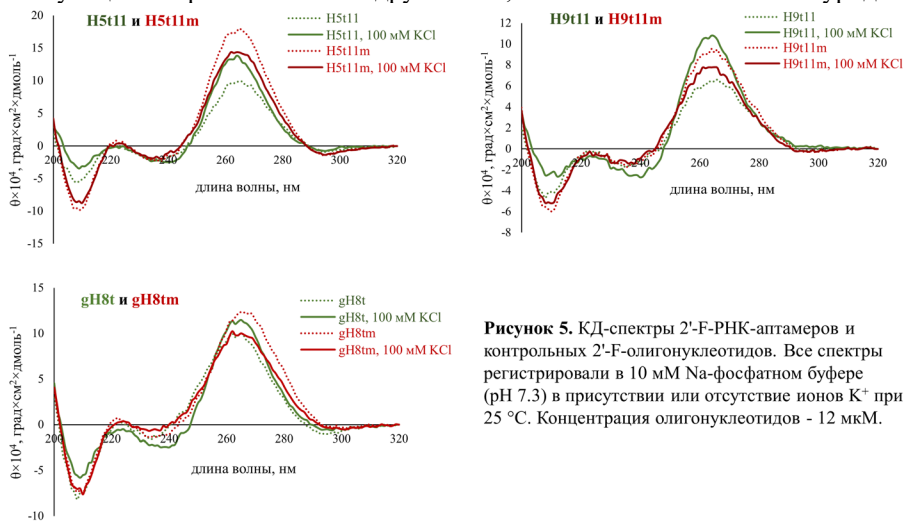
В качестве дополнительного метода анализа связывания аптамеров с белковой мишенью была использована колориметрическая система детекции, методологически аналогичная иммуноферментному анализу. Для проведения анализа белок-мишень нековалентно иммобилизовали в лунках микропланшета с высокой сорбцией. После добавления биотин-модифицированного аптамера образовавшийся комплекс визуализировали с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и хромогенного субстрата АВТS. Рассчитанные из данных колориметрического анализа значения  $K_d$  комплексов аптамеров с суммарным гемоглобином отличаются от значений, полученных с использованием гетерофазного биолюминесцентного метода анализа, примерно в два раза (табл. 3). Предположительно, наиболее вероятной причиной выявленных отличий могут быть различные схемы анализа. Так, в ходе биолюминесцентного анализа

иммобилизованный на планшете аптамер связывал гемоглобин из раствора, а при колориметрическом анализе, наоборот, происходило связывание иммобилизованного гемоглобина со свободным аптамером.

На основании полученных результатов для дальнейшего анализа были выбраны аптамеры H5t1 и H9t1. Поскольку длина каждого из этих аптамеров составляла примерно 60 нуклеотидов, была проведена их дополнительная минимизация (рис. 2) до 42 (H5t11) или 43 нуклеотидов (H9t11).

#### 4. Исследование вторичной структуры гемоглобин-связывающих аптамеров

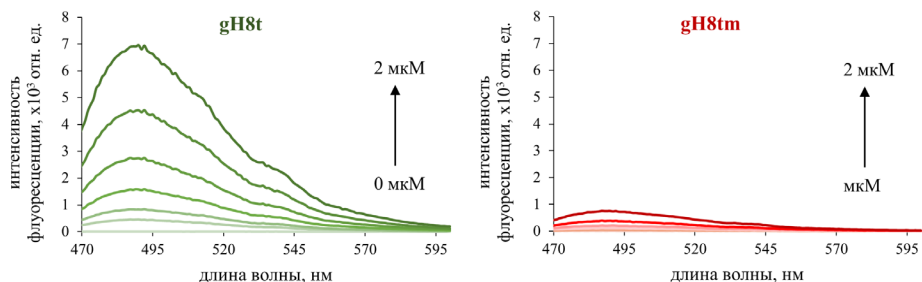
Для экспериментального доказательства формирования G4-структур, предположительно образующихся по данным анализа с помощью алгоритма VIENNA RNAfold, были использованы аптамеры H5t11, H9t11 и gH8t. В качестве контролей, заведомо не способных формировать квадруплексы, были использованы 2'-F-РНК H5t11m, H9t11m и gH8tm с аналогичными нуклеотидными последовательностями, в которых остатки гуанозина, предположительно участвующие в образовании G-квадруплексов, были заменены на остатки уридина.



**Рисунок 5.** КД-спектры 2'-F-РНК-аптамеров и контрольных 2'-F-олигонуклеотидов. Все спектры регистрировали в 10 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7.3) в присутствии или отсутствии ионов K<sup>+</sup> при 25 °С. Концентрация олигонуклеотидов - 12 мкМ.

В КД-спектрах аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t были зарегистрированы положительный пик в районе 260 нм и отрицательный пик около 240 нм, характерные как для параллельных квадруплексов, так и для А-формы РНК, а также отрицательный пик в области 210 нм, характерный для А-формы. Добавление ионов калия, способствующих стабилизации G4-структур, в случае аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t приводило к увеличению интенсивности пиков на 260 нм и уменьшению интенсивности пика на 210 нм (рис. 5). В КД-спектрах контрольных олигонуклеотидов H5t11m, H9t11m и gH8tm также были зарегистрированы положительный пик в районе 260 нм и отрицательные пики в

области 240 и 210 нм. В отличие от аптамеров, добавление ионов калия в растворы контрольных 2'-F-РНК приводило к уменьшению интенсивности положительного пика и никак не влияло на интенсивность отрицательных (рис. 5). Полученные результаты указывают на формирование параллельных квадруплексов в составе исследуемых аптамеров.



**Рисунок 6.** Спектры флуоресценции красителя ThT (2 мкМ) в 20 мМ Трис-НСl буфере (рН 7.5), содержащем 40 мМ КСl, при различных концентрациях аптамера gH8t или контрольного 2'-F-олигонуклеотида gH8tm (0-2 мкМ).

В качестве дополнительного метода исследования структуры 2'-F-РНК-аптамеров был использован анализ связывания с квадруплекс-специфичным флуоресцентным красителем тиофлавином Т (ThT). Интенсивность собственной флуоресценции красителя ThT в Трис-НСl/КСl буфере была сопоставима по величине с фоновым сигналом. При добавлении к раствору ThT любого из трех аптамеров происходило значительное увеличение интенсивности флуоресценции с характерным пиком в районе 487 нм. Последовательное повышение концентрации аптамера приводило к увеличению интенсивности флуоресцентного сигнала. При этом в присутствии любого из трех контрольных олигонуклеотидов наблюдалась значительно более низкая интенсивность сигнала по сравнению с соответствующим аптамером в той же концентрации. На рис. 6 приведены для примера спектры флуоресценции красителя ThT в присутствии аптамера gH8t и контрольного олигонуклеотида gH8tm. Аналогичные зависимости были получены для аптамеров H5t11 и H9t11.

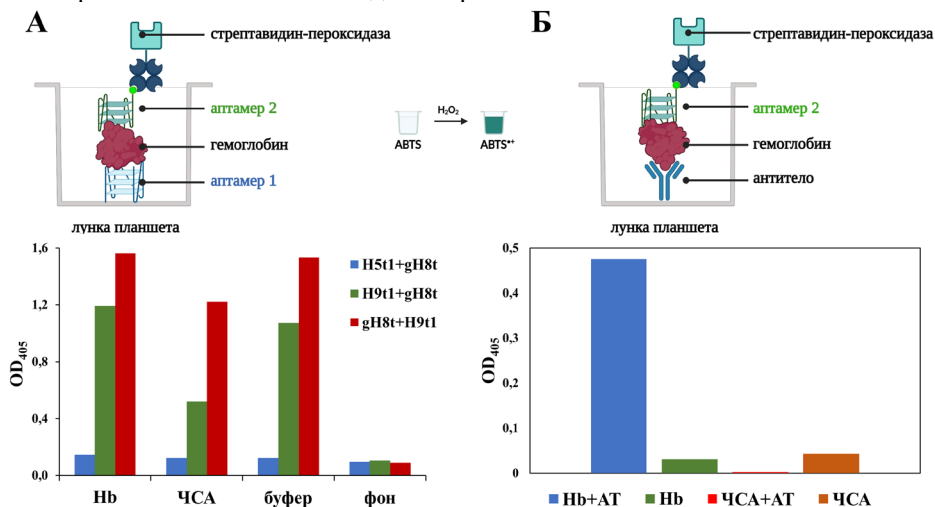
Полученные данные указывают на то, что наиболее вероятной вторичной структурой G-богатых фрагментов в составе гемоглобин-специфичных аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t является параллельный квадруплекс.

## 5. Колориметрическая детекция суммарного гемоглобина в сэндвич-формате

Для детекции суммарного гемоглобина в растворе была сконструирована сэндвич-система на основе двух 2'-F-РНК-аптамеров. Один из них был ковалентно иммобилизован на поверхности лунки планшета, а второй выполнял функции

репортерной молекулы для колориметрической детекции с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и хромогенного субстрата ABTS (рис. 7А).

При использовании аптамера Н5т1 для связывания белка-аналита не удалось зарегистрировать достоверное увеличение оптической плотности по сравнению с контрольными образцами. Его замена на аптамер Н9т1 или gН8т привела к ярко выраженному увеличению оптической плотности в лунках, содержащих суммарный гемоглобин (рис. 7А). В то же время аналогичное увеличение оптической плотности раствора наблюдалось также в контрольных лунках, содержащих ЧСА или промывочный буфер (рис. 7А). При этом сигнал в контрольных образцах, не содержащих иммобилизованный аптамер, оставался на уровне фоновых значений. Мы предполагаем, что высокий уровень неспецифического сигнала обусловлен формированием комплексов между двумя аптамерами – компонентами сэндвич-пары.



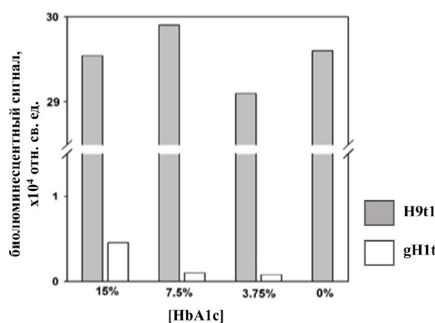
**Рисунок 7.** Колориметрическая детекция суммарного гемоглобина. **А.** Сэндвич-система на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров. Первый компонент пары ковалентно иммобилизован на поверхности СОО-модифицированного микропланшета, второй компонент использован в концентрации 200 нМ. Концентрация белка (Hb или ЧСА) - 2 мкМ. Отрицательный контроль - промывочный буфер без белка. Столбцы «фон» соответствуют лункам планшета без аптамера. **Б.** Сэндвич-система на основе пары антитело-аптамер. Гемоглобин-специфичные антитела нековалентно иммобилизованы на поверхности лунок микропланшета, 3'-биотинилированный аптамер Н9т1 использован в концентрации 200 нМ. Концентрация белка (Hb или ЧСА) – 2 мкМ.

Для проверки данного предположения была сконструирована альтернативная система детекции сэндвич-типа, в которой иммобилизованный в лунках планшета аптамер был заменен на антитело (схема на рис. 7Б). В этом случае интенсивность

колориметрического сигнала увеличивалась пропорционально повышению концентрации белка-аналита в растворе. При этом в отсутствие антител в лунках планшета или при использовании ЧСА в качестве контроля уровень сигнала не превышал фоновых значений, что свидетельствует о специфичности детекции гемоглобина (рис. 7Б). Полученные результаты показывают принципиальную возможность использования 2'-F-РНК-аптамера в качестве репортерного компонента в составе сэндвич-системы со специфическими антителами.

### 6. Биоломинесцентная детекция гликированного гемоглобина в сэндвич-формате

Была также исследована возможность биоломинесцентной детекции гликированного гемоглобина в растворе с преобладанием немодифицированного гемоглобина с использованием двух 2'-F-РНК-аптамеров, обладающих различной специфичностью связывания. Проведение анализа в таких условиях позволяет смоделировать условия детекции в реальных образцах крови. Для детекции гликированного гемоглобина биотин-содержащий аптамер (H9t1 или gH1t) был иммобилизован на поверхности планшета. После внесения раствора с общей концентрацией гемоглобина 2 мкМ и заданной долей гликированного гемоглобина HbA1c (3.75, 7.5 или 15 %) для визуализации комплексов был использован конъюгат обелина с гемоглобин-специфичными антителами.



**Рисунок 8.** Определение гликированного гемоглобина HbA1c в присутствии суммарного гемоглобина методом гетерофазного биоломинесцентного анализа в формате сэндвич-системы. Данные получены к.б.н. Е.Е. Башмаковой (ИБФ СО РАН).

приблизительно одинаковые значения интенсивности биоломинесцентного сигнала во всех образцах, содержащих гемоглобин (различия в значениях составили не более 3%). При использовании аптамера gH1t, связывающего только гликированный гемоглобин, интенсивность биоломинесцентного сигнала изменялась пропорционально концентрации HbA1c в образцах (рис. 8). Данный результат подтверждает возможность использования полученных 2'-F-РНК-аптамеров для детекции суммарного гемоглобина либо только гликированного гемоглобина в одном и том же модельном образце методом гетерофазного биоломинесцентного анализа.

## 7. Получение 2'-F-РНК-аптамеров, связывающих фотопротейн обелин, анализ нуклеотидных последовательностей аптамеров и их минимизация

В рамках данной работы мы предложили принципиально новый способ введения обелина в биоаналитическую систему через нековалентное связывание с использованием обелин-специфичного аптамера. Для реализации данного подхода необходимо было получить аптамеры, способные селективно связывать обелин. В качестве мишени для отбора аптамеров был использован рекомбинантный обелин, содержащий на N-конце гексагистидиновый фрагмент для иммобилизации на Ni-содержащих сорбентах (His<sub>6</sub>-Обе). Для удаления из обогащенной библиотеки молекул 2'-F-РНК, связывающихся с носителем, на каждом раунде отбора проводили негативную селекцию с использованием не нагруженного белком носителя в качестве мишени. На последних двух раундах отбора (11 и 12) резко увеличивали давление селекции, используя для отмывки слабо связывающихся 2'-F-РНК буферные растворы с высокой концентрацией соли или мочевины.

Обогащенные библиотеки после 6, 10 и 12 раундов селекции были переведены в дцДНК-форму для высокопроизводительного секвенирования. Полученные после биоинформатического анализа данных секвенирования нуклеотидные последовательности индивидуальных 2'-F-РНК-аптамеров были упорядочены в соответствии с их представленностью в обогащенной библиотеке после 10 раундов селекции (табл. 4).

**Таблица 4.** Наиболее часто встречающиеся нуклеотидные последовательности после селекции 2'-F-РНК-аптамеров на обелин.

аптамер	нуклеотидная последовательность рандомизированного участка, 5'-3'	частота встречаемости, %		
		6 раунд	10 раунд	12 раунд
O79	UGUGAAGUCGCAUUUAAUUGCUGGCGCCGUU UACUUGCUC	2.7	25.2	11.0
O6	GACGUGCGCGGGAAAGACCGACGCUCUACCC CUACAAGCUU	2.3	17.0	12.0
O3	UGUGAAGUCGCACUUAGUUGCUGGCGUCGUU UACUUGCUC	6.7	14.2	0.0
O4	CUAGGCUGUGCGGGUGCCCUAUCUUAUCCG CGCCUCUCCU	0.5	12.4	28.0
O5	GUUGUACGCGGUUGGCAAUCCGCGUUGCUIU ACGGGUUCC	2.0	8.8	7.0
O1	UGUGAAGUCGCAUUUAAUUGCUGGCCCCGUU UACUUGCUC	16.1	4.8	0.0
O11	CAGGGUGCCUACAUCCGAAUUAUAUCUGCA CCC GCGCGC	0.0	3.9	3.8
O80	GACGUGCGCGGGAAAGACCGACGCUCUACCC GAACAAGC	0.1	3.2	0.0
O15	GCCUUGGACAAAUGGGGAUAAUAAGCCCGC CCUUCGCAC	0.0	2.3	0.0
O35	UAGGGUACGCGGACAGCGAUGGGACCGCGU GCCAGCCCC	0.0	0.6	17.0



Анализ данных секвенирования выявил существенные различия между наиболее представленными последовательностями обогащенных библиотек. После 10-го раунда селекции 77.6 % от всех последовательностей составили аптамеры O79 (25.2 %), O6 (17 %), O3 (14.2 %), O4 (12.4 %) и O5 (8.8 %). После двух дополнительных раундов селекции доля последовательности O79 в библиотеке уменьшилась до 11 %, O6 – до 12 %, O3 – до 0 %, O5 – до 7 %, а доля O4 увеличилась более, чем в 2 раза, до 28 %. Кроме того, среди лидирующих последовательностей в библиотеке после 12 раундов был дополнительно выявлен аптамер O35, доля которого увеличилась с 0.6 до 17 % после двух дополнительных раундов селекции. Для последующего анализа аффинности были выбраны аптамеры O3, O4, O5, O6, O35 и O79.

**Таблица 5.** Последовательности укороченных 2'-F-РНК-аптамеров, использованные для определения аффинности к обелину.

аптамер	нуклеотидная последовательность, 5'-3'	длина, нт
O3t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCA AUGUGAAGUCGCACUUAGU UGCUGGCGUCGUUUACUUGCUC	63
O4t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAACUAGGCUGUGCGCGGGUGC CCUAUCUUAUCCGCGCCUCUCCU	64
O6t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCAAGACGUGCGCGGGAA AGACCGACGCUCUACCCCUACAAGCU	63
O79t	GGGAGACAAGAAUAAACGCUCA AUGUGAAGUCGCAUU UAAUUGCUGGCGCCGUUUACUUGCUC	63

При исследовании влияния константных участков в составе обогащенной библиотеки после 10-го раунда на связывание белка-мишени было показано, что 3'-константный участок не является необходимым для связывания. Поэтому последовательности кандидатных аптамеров, наиболее представленных после 10-го раунда, были укорочены с 87 до 63-64 нуклеотидов за счет удаления этого фрагмента. Нуклеотидные последовательности укороченных аптамеров O3t, O4t, O6t и O79t представлены в табл. 5.

## 8. Исследование аффинности индивидуальных аптамеров к обелину

Для исследования формирования комплексов индивидуальных аптамеров с обелином был использован метод DRACaLA, основанный на различиях в подвижности свободных [<sup>32</sup>P]-меченых нуклеиновых кислот и НК-белковых комплексов после точечного нанесения исследуемого раствора на поверхность сухого нитроцеллюлозного фильтра. Чтобы оценить влияние гексагистидинового фрагмента в составе белка-мишени на аффинность аптамеров, мы провели сравнительный анализ связывания индивидуальных аптамеров с His<sub>6</sub>-Obe и обелином дикого типа (wt-Obe). Как видно из данных, приведенных в табл. 6, аптамеры O3t и O79t связываются с обоими белками. При этом значения K<sub>d</sub> для

аптамер-белковых комплексов зависели от типа обелина. Аптамеры O4t, O6t, O5 и O35 связывались только с His<sub>6</sub>-Obe и не формировали комплексов с wt-Obe. Полученные результаты убедительно показывают, что аптамеры, полученные селекцией на гексагистидин-модифицированный белок, могут быть высокопредставленными в обогащенной библиотеке и проявлять высокое сродство к мишени селекции, но при этом не образовывать комплексов с белками дикого типа. Это говорит о необходимости тестирования полученных данным способом аптамеров на способность узнавать природный белок-мишень, и критически важно для тех случаев, когда аптамер предназначен для дальнейшего применения в составе диагностических систем или адресных терапевтических препаратов.

**Таблица 6.** Значения  $K_d$  комплексов 2'-F-РНК-аптамеров с His<sub>6</sub>-Obe и wt-Obe.

аптамер	$K_d$ , мкМ	
	His <sub>6</sub> -Obe	wt-Obe
<b>O79t</b>	0.34±0.06	0.72±0.10
<b>O3t</b>	0.23±0.05	1.37±0.16
<b>O4t</b>	0.58±0.34	нет связывания
<b>O6t</b>	0.94±0.39	нет связывания
<b>O35</b>	0.12±0.04	нет связывания
<b>O5</b>	0.45±0.14	нет связывания

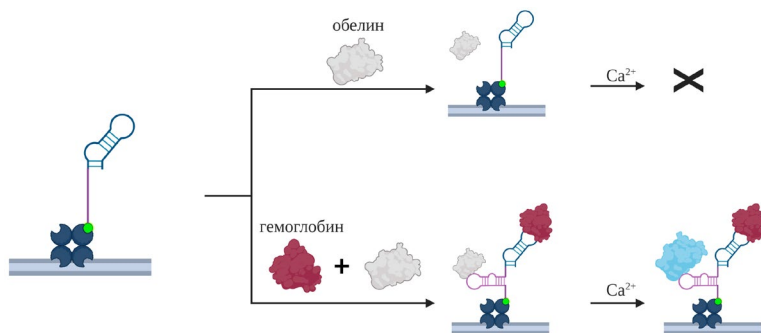
Анализ связывания выполнен совместно с к.х.н. Воробьевым П. Е.

В качестве обелин-связывающего модуля для конструирования новых систем детекции был выбран аптамер O79t. Дополнительная минимизация последовательности позволила сократить длину аптамера до 44 нуклеотидов (O79t1), сохранив его сродство к мишени (значение  $K_d$  для комплекса с wt-Obe составило 1.9±0.5 мкМ).

## **9. Создание бифункциональных конструкций на основе 2'-F-РНК-аптамеров для биолюминесцентной детекции гемоглобина**

На заключительном этапе работы была исследована возможность использования аптамера O79t1 для нековалентного связывания обелина в составе бифункциональных конструкций. Предложенные нами бифункциональные аптамеры состоят из двух структурных модулей: аптамера, отвечающего за узнавание молекулы-аналита и обелин-специфичный аптамер в качестве модуля, связывающего репортерную молекулу. Основным требованием к таким аптамерным конструкциям является генерация аналитического сигнала только в присутствии аналита. Это означает, что при наличии в образце только обелина бифункциональный аптамер не должен связывать этот белок. Для решения данной задачи был использован рациональный дизайн бифункциональной конструкции, основанный на следующих принципах. Прежде всего, гемоглобин-связывающий аптамер в составе бифункциональной конструкции практически не изменяет свою

структуру, в то время как фрагмент обелин-связывающего аптамера образует комплементарный комплекс с фрагментом гемоглобин-связывающего аптамера или с дополнительным олигонуклеотидным линкером. За счет этого вторичная структура обелин-связывающего аптамера в составе бифункциональной конструкции отличается от структуры свободного аптамера, необходимой для связывания с мишенью. Связывание гемоглобина с соответствующим аптамерным модулем приводит к «переключению» функциональной активности двухаптамерной конструкции - структурным перестройкам всей молекулы, в результате которых обелин-связывающий аптамер восстанавливает пространственную структуру, необходимую для связывания с обелином. Нековалентное связывание обелина, в свою очередь, дает возможность генерировать специфический биолюминесцентный сигнал после добавления ионов  $Ca^{2+}$ .

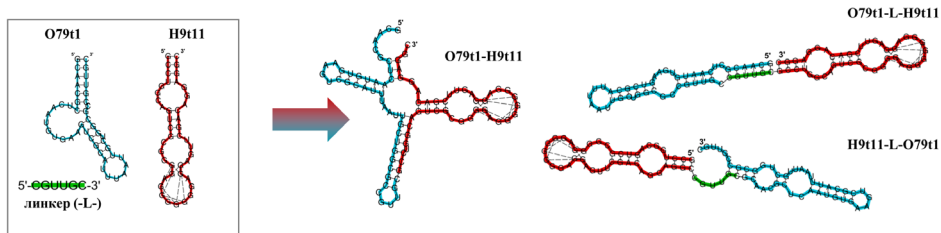


**Рисунок 9.** Принципиальная схема микропланшетной биолюминесцентной детекции гемоглобина с помощью бифункционального аптамера.

Чтобы проверить предложенную стратегию конструирования бифункциональных аптамеров на практике, в качестве аптамерных модулей были использованы 2'-F-РНК-аптамеры Н9т11 и О79т1 со сродством к суммарному гемоглобину и обелину, соответственно. На основании анализа предполагаемых вторичных структур для набора вариантов бифункциональных аптамеров были выбраны три аптамера, соответствующих сформулированным выше требованиям (рис. 10). В первом варианте 5'-концевой нуклеотид аптамера Н9т11 непосредственно присоединялся к 3'-концевому нуклеотиду аптамера О79т1 (5'-О79т1-Н9т11-3'), а во втором варианте аптамеры были соединены гексануклеотидным линкером, соответствующим 3'-концевому фрагменту аптамера О79т1 (5'-Н9т11-Л-О79т1-3' и 5'-О79т1-Л-Н9т11-3').

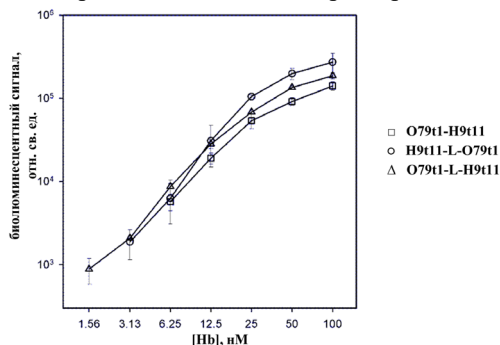
Созданные бифункциональные аптамеры были использованы для биолюминесцентной детекции гемоглобина в микропланшетном формате. Для этого иммобилизованные в лунках микропланшета аптамеры инкубировали с

гемоглином в присутствии обелина. После добавления раствора  $\text{CaCl}_2$  регистрировали биолюминесцентный сигнал.



**Рисунок 10.** Предполагаемые вторичные структуры бифункциональных 2'-F-РНК-аптамеров, полученные по данным Vienna RNAfold. Пунктирными линиями соединены остатки гуанозина, участвующие в формировании G-квадруплексов.

Как видно из приведенных на рис. 11 кривых, при добавлении гемоглобина в систему наблюдалось увеличение интенсивности биолюминесцентного сигнала, пропорциональное концентрации анализата. Зависимости величины сигнала от концентрации гемоглобина характеризовались небольшими отличиями.



**Рисунок 11.** Биолюминесцентная детекция суммарного гемоглобина с помощью бифункциональных аптамеров при одновременном добавлении обелина (100 нМ) и суммарного гемоглобина (1.56–100 нМ). Данные получены к.б.н. Красицкой В. В. (ИБФ СО РАН).

Таким образом, созданные бифункциональные конструкции обеспечивали специфический биолюминесцентный сигнал при связывании гемоглобина. К достоинствам предложенного метода детекции можно отнести сокращение числа стадий анализа за счет одновременного добавления анализируемого и репортерного белков, возможность использования свободного обелина без конъюгирования с аптамером и, соответственно, возможность ренатурации структуры аптамерной молекулы в режиме «нагрев-охлаждение» перед началом анализа без риска термической денатурации репортерного белка. Чувствительность предложенного метода сопоставима с чувствительностью описанных в литературе аптасенсоров с другими типами аналитического сигнала, обеспечивающих детекцию в наномолярном диапазоне концентраций гемоглобина.

## Выводы

1. Методом селекции *in vitro* получены новые 2'-F-РНК-аптамеры, способные связывать суммарный гемоглобин человека либо только гликированный гемоглобин HbA1c. Оптимизированы нуклеотидные последовательности аптамеров, охарактеризовано их сродство к мишеням. Полученные аптамеры могут быть использованы для билюминесцентной микропланшетной детекции гликированного и суммарного гемоглобина.
2. Наиболее вероятной структурой в составе гемоглобин-связывающих аптамеров H5t11, H9t11 и gH8t является параллельный G-квадруплекс.
3. Аптамер H9t1 может быть использован для колориметрической микропланшетной детекции суммарного гемоглобина как в системе с прямой иммобилизацией анализируемого белка, так и в сэндвич-формате с применением специфических антител.
4. Впервые методом селекции *in vitro* получены 2'-F-РНК-аптамеры, способные связывать фотопротеин обелин. Охарактеризовано их сродство к гексагистидин-содержащему обелину и обелину дикого типа. За счет оптимизации нуклеотидной последовательности аптамер O79 укорочен с 87 до 44 нуклеотидных звеньев с сохранением высокой аффинности к мишени.
5. Впервые предложена стратегия нековалентного связывания обелина через соответствующий аптамер при создании билюминесцентных систем детекции. Создана серия новых бифункциональных конструкций с переключаемой активностью, содержащих в одной молекуле гемоглобин-связывающий и обелин-связывающий аптамерные модули. Показана принципиальная возможность их использования для билюминесцентной микропланшетной детекции гемоглобина.

## Публикации по теме диссертации

1. Vorobyeva M.A., Davydova A.S., Vorobjev P.E., Pyshnyi D.V. and Venyaminova A.G. Key aspects of nucleic acid library design for in vitro selection // *Int. J. Mol. Sci.* - 2018. - V. 19. – P. 470. (обзор).
2. Красицкая В.В., Давыдова А.С., Воробьева М.А., Франк Л.А. Ca<sup>2+</sup>-регулируемый фотопротеин обелин как мишень для отбора РНК-аптамеров // *Биоорг. химия.* - 2018. - Т. 44. - С. 287–293.
3. Davydova A.S., Krasheninina O.A., Tupikin A.E., Kabilov M.R., Venyaminova A.G., and Vorobyeva M.A. Synthesis of random DNA libraries for in vitro selection and analysis of their nucleotide composition // *Russ. J. Bioorg. Chem.* - 2019. - V. 45. - P. 655–660.
4. Davydova A., Vorobyeva M., Bashmakova E., Vorobjev P., Krasheninina O., Tupikin A., Kabilov M., Krasitskaya V., Frank L., Venyaminova A. Development and characterization of novel 2'-F-RNA aptamers specific to human total and glycosylated hemoglobins // *Anal. Biochem.* - 2019.- V. 570. - P. 43-50.
5. Davydova A.S., Timoshenko V.V., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Venyaminova A.G., Vorobyeva M.A. G-quadruplex 2'-F-modified RNA aptamers targeting hemoglobin: structure studies and colorimetric assays // *Anal. Biochem.* - 2020. - V. 611. – P. 113886.
6. Davydova A., Krasitskaya V., Vorobjev P., Timoshenko V., Tupikin A., Kabilov M., Frank L., Venyaminova A. and Vorobyeva M. Reporter-recruiting bifunctional aptasensor for bioluminescent analytical assays // *RSC Adv.* - 2020. - V. 10. – P. 32393.