

На правах рукописи

**ЕПАНЧИНЦЕВА АННА ВАЛЕРЬЕВНА**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
И СФЕРИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА  
В СОСТАВЕ НЕКОВАЛЕНТНЫХ АССОЦИАТОВ**

02.00.10 биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск-2020

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

Научный руководитель:

**Пышная Инна Алексеевна**, к.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО  
РАН

Официальные оппоненты:

**Миронова Надежда Львовна**, д.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО  
РАН, в.н.с.

**Шестопалов Михаил Александрович**, к.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, зав.  
лаб.

**Варижук Анна Михайловна**, д.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный научно-клинический центр физико-химической  
медицины Федерального медико-биологического агентства», с.н.с.

Защита состоится «3» апреля 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630056 Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан «  » марта 2020 г.

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



Коваль В.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Создание эффективных транспортеров терапевтических молекул, в частности, терапевтических нуклеиновых кислот (НК), является одной из актуальных проблем современной фундаментальной медицины. Не менее важной задачей является разработка сенсоров для выявления широкого круга мишеней (НК, токсинов, лекарственных препаратов, наркотиков и др.) с низким пределом чувствительности, которые, как правило, работают за счет взаимодействия аптамер-мишень или НК/НК.

Наночастицы золота (НЧЗ) – уникальный материал в качестве носителя НК для создания сенсоров и систем внутриклеточной доставки НК благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам. Широко распространено присоединение НК к НЧЗ за счёт образования ковалентной тиольной связи Au-S. Ковалентные ассоциаты НЧЗ и НК стали повсеместно изучаться после пионерских работ Чада Миркина [Letsinger, *Phosphorus, Sulfur, Silicon, Relat. Elem.*, 1999]. Однако НК, в том числе присоединенные ковалентно, способны взаимодействовать с поверхностью золота нековалентно за счет образования электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных связей, причем взаимодействие зависит от длины и нуклеотидной последовательности НК, ее одно- и двуцепочечного состояния и структурированности; свой вклад в образование нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК вносят также совокупный заряд фосфатных групп и индивидуальные свойства азотистых оснований нуклеиновых кислот. Наблюдаемые закономерности взаимодействия НК с поверхностью золота зависят от типа золотого субстрата (пленки, электроды, наночастицы различного размера и формы) и адсорбируемых молекул, условий инкубации, присутствия вспомогательных реагентов, метода исследования [Carnerero, *Chem. Phys. Chem.*, 2017]. Можно выделить несколько моделей нековалентного связывания НЧЗ и НК, однако общепризнанной модели нет. Эта несогласованность - следствие сложности учета комплексного влияния множества факторов на связывание НК с поверхностью золота. Важно отметить, что нековалентные взаимодействия НЧЗ и НК в низкосолевых условиях на данный момент практически не представлены в литературе.

**Цель работы** – систематическое исследование закономерностей нековалентного взаимодействия сферических наночастиц золота (НЧЗ) диаметром  $12,7 \pm 2$  нм с нуклеиновыми кислотами (НК) в условиях, максимально исключающих влияние сторонних факторов, и анализ стабильности нековалентных ассоциатов НЧЗ и нуклеиновых кислот в различных средах.

**Задачи**, которые решали в рамках работы, включали в себя:

1) разработку подхода к анализу нековалентного взаимодействия НЧЗ с одноцепочечными олигонуклеотидами по электрофоретической подвижности и коллоидной стабильности НЧЗ;

2) количественный анализ связывания НЧЗ с олигонуклеотидами для сравнения аффинности к НЧЗ олигонуклеотидов, отличающих по длине и нуклеотидному составу, а также для оценки стабильности полученных ассоциатов в различных средах;

3) исследование влияния последовательности и структуры олигонуклеотидов на их взаимодействие с НЧЗ;

4) получение ассоциатов НЧЗ и дуплексов НК с наиболее плотным олигонуклеотидным покрытием;

5) изучение стабильности ассоциатов НЧЗ-НК в условиях имитирующих клеточный цитозоль, и исследование потенциала ассоциатов на основе НЧЗ для доставки терапевтических НК в живые клетки на примере подавления флуоресценции белка GFP под действием siРНК.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В работе предложен удобный быстрый способ получения нековалентных ассоциатов НЧЗ и НК, как одноцепочечных, так и двуцепочечных, при необходимости декорированных дополнительными слоями белков, полиэтиленгликоля, липидов. Предложен способ быстрой оценки сродства олигонуклеотидов к НЧЗ путем проведения электрофоретического разделения их ассоциатов в агарозном геле. Представлено исследование сложного комплекса нековалентных взаимодействий стабилизированной цитрат-ионами поверхности НЧЗ и олигонуклеотидов в условиях, максимально исключающих влияние растворителя, компонентов буферных растворов, соединений-стабилизаторов НЧЗ, с использованием одновременно нескольких методов количественной оценки эффективности нековалентного взаимодействия НЧЗ и НК. Впервые в данной работе проведен анализ высокопроизводительного секвенирования пула ДНК-последовательностей, отобранных в процессе селекции *in vitro* к НЧЗ, а также был применен модифицированный метод электрофореза в агарозном геле, позволяющий быстро оценить скорость связывания НЧЗ с НК и прочность образующихся ассоциатов.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1) Быстрая и прочная адсорбция одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов на поверхности свежеприготовленных цитратным методом сферических наночастиц золота без добавления веществ-стабилизаторов и изменения рН и ионной силы раствора достигается после их инкубации при 56 °С в течение 30 минут.

2) Электрофоретический анализ ассоциатов НЧЗ с олигонуклеотидами позволяет получить быструю оценку относительного сродства олигонуклеотидов одной длины к НЧЗ.

3) В изученных условиях связывания одинаковые по длине олигоаденилаты и олиготимидилаты обладают повышенной аффинностью к НЧЗ, а олигоцитидилаты – пониженной.

4) Олигонуклеотидное покрытие устойчиво к вытеснению высокомолекулярными тиол-содержащими соединениями и стабильно при хранении в течение 7 месяцев.

5) Неструктурированные G,T,A-богатые последовательности обладают высокой аффинностью к НЧЗ, а любой тип взаимодействия азотистых оснований между собой отрицательно влияет на эффективность адсорбции олигонуклеотидов на НЧЗ в низкосолевых условиях.

6) Введение двух фосфорилгуанидиновых остатков вблизи 3'-конца одной из цепей РНК-дуплекса или одноцепочечной ДНК либо создание многослойной конструкции на основе наночастиц золота и липидной оболочки являются эффективными способами защиты НК, адсорбированных на наночастицах золота, от действия нуклеаз.

7) Предложен способ эффективного покрытия наночастиц золота дуплексами олигонуклеотидов вплоть до 160 дуплексов на одну НЧЗ диаметром  $12,7 \pm 2$  нм.

**Публикации и апробация работы.** По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Результаты, представленные в работе, достоверны и апробированы на научных конференциях всероссийского и международного уровня: Всероссийской конференции по наноматериалам НАНО-2016, International Symposium of Materials on Regenerative Medicine ISOMRM 2017, международном семинаре “Targeting RNA World” 2018, 3rd International Symposium on Nanoparticles-Nanomaterials and Applications ISN2 A 2018, мультиконференции «Биотехнология – медицине будущего» 2019.

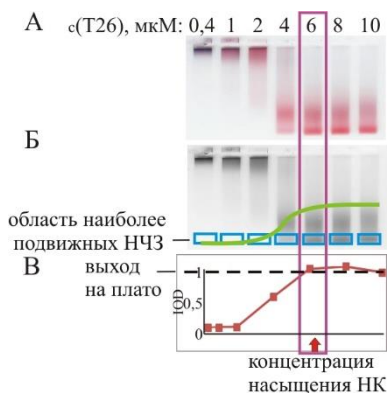
**Структура и объем работы.** Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 194 страницах, содержит 63 рисунка и 22 таблицы. Библиография включает 410 литературных источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Анализ связывания НК с НЧЗ электрофорезом в агарозном геле

#### 1.1. Разработка методики анализа подвижности ассоциатов НЧЗ-НК

На первом этапе работы исследовали взаимодействие НЧЗ и олигонуклеотидов методом агарозного гель-электрофореза. Для анализа НЧЗ в геле дополнительной визуализации не требуется благодаря их насыщенному красному цвету, что послужило основой методики. Сродство олигонуклеотидов к наночастицам сравнивали, проводя электрофорез с набором проб, содержащих одну и ту же концентрацию наночастиц (0,1 мкМ) и разные концентрации олигонуклеотидов (0,4 -10 мкМ) (рис. 1А). Электрофорез вели в 0,8 % агарозном геле и буферном растворе Трис-Gly (25 мМ Трис, 250 мМ Gly, pH 8,3) при напряженности электрического поля 5 В/см в течение 30 мин.



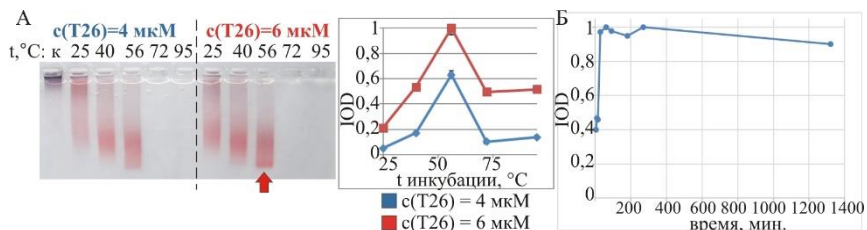
**Рис. 1.** Анализ агарозного геля после проведения электрофореза. А – сканированное изображение геля, содержащего ассоциаты НЧЗ-T26, Б – обработка черно-белого изображения с выделением в каждой дорожке областей одинаковой площади, содержащих наиболее подвижные НЧЗ, и получением числового эквивалента интенсивности окрашивания выделенных областей, В – концентрационная зависимость связывания НЧЗ с T26, красной стрелкой обозначена концентрации T26, при которой достигается плато насыщения (концентрация насыщения). IOD – интегральная оптическая плотность. Здесь и далее красной стрелкой обозначена концентрация насыщения НК.

НЧЗ не обладают заметной электрофоретической подвижностью, связывание с возрастающей концентрацией отрицательно заряженных олигонуклеотидов приводило к увеличению их подвижности в геле. Оценивали интенсивность окрашивания участков геля с наночастицами максимальной подвижности и строили концентрационные профили интенсивности окраски (рис. 1Б). Полученные графики имели характерную сигмовидную форму. Определяли концентрацию насыщения олигонуклеотида, при которой значение интенсивности окрашивания выходило на плато (рис. 1В).

#### 1.2. Зависимость связывания НЧЗ с НК от температуры и продолжительности инкубации

Изучили влияние продолжительности и температуры инкубации на адсорбцию НК на НЧЗ для установления оптимальных условий получения

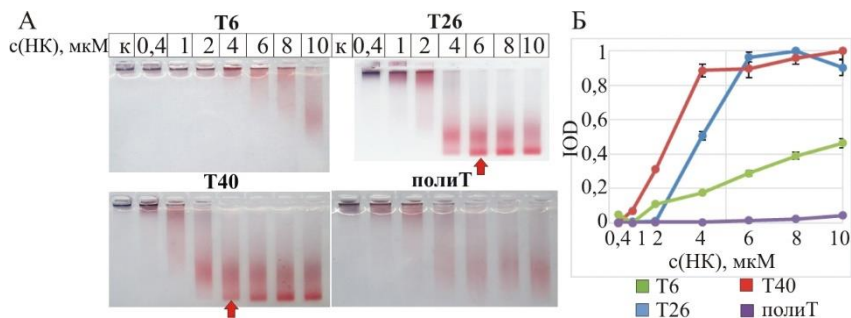
ассоциатов НЧЗ-НК. Связывание НЧЗ с олигонуклеотидами усиливалось при повышении температуры инкубации, однако при температурах выше 70 °С возникал риск слипания НЧЗ (рис. 2А). При увеличении времени инкубации до 30 мин при 56 °С степень адсорбции достигала плато (90 %) (рис. 2Б). Далее во всех экспериментах по связыванию НЧЗ и одноцепочечных НК инкубацию реакционной смеси проводили в течение 30 мин при 56 °С.



**Рис. 2.** Исследование влияния температуры и продолжительности инкубации на эффективность адсорбции Т26 на НЧЗ. А - анализ подвижности ассоциатов НЧЗ-Т26 электрофорезом в 0,8 % агарозном геле, Б - зависимость эффективности адсорбции НК на НЧЗ от продолжительности инкубации.

### 1.3. Зависимость связывания НЧЗ с НК от концентрации, длины, заряда, последовательности одноцепочечных НК

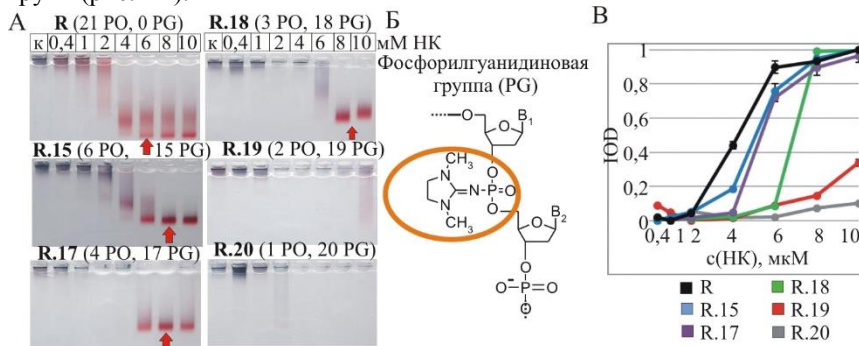
На следующем этапе на примере олиготимидилатов выяснили, что с ростом длины олигонуклеотида концентрация насыщения уменьшается, что объясняется увеличением отрицательного заряда на НЧЗ с ростом длины НК в одних и тех же концентрациях (рис. 3А, Б).



**Рис. 3.** Зависимость эффективности адсорбции НК на НЧЗ от длины НК: А - сканированное изображение геля, Б - концентрационная зависимость связывания НЧЗ с НК разной длины.

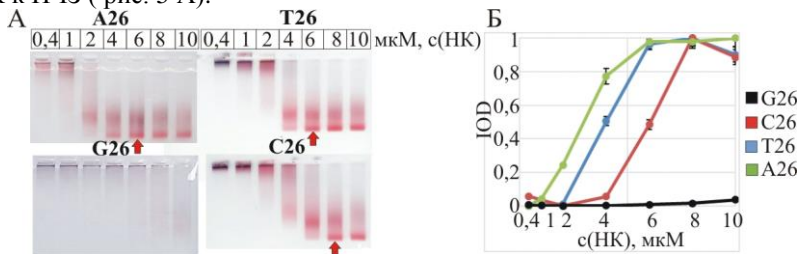
Чтобы подтвердить роль числа фосфатных групп в молекулах олигонуклеотидов для подвижности их ассоциатов с НЧЗ, использовали набор 21-звенных олигонуклеотидов (R) с разным количеством незаряженных фосфорилгуанидиновых (PG) модификаций (0, 10, 14, 16,

17, 18, 19, 20). Видно, что снижение числа отрицательно заряженных групп не только увеличило пороговую концентрацию НК (рис. 4А, Б), но и уменьшило максимально достижимую электрофоретическую подвижность НЧЗ на 23-33 % для олигонуклеотидов, несущих 15-18 PG-групп (рис. 4В).



**Рис. 4.** Зависимость эффективности адсорбции НК на НЧЗ от числа заряженных групп (PO) в НК: А – сканированное изображение геля, Б – структура PG-группы в составе олигонуклеотида, В – концентрационная зависимость связывания НЧЗ с НК с разным числом PG-групп.

Далее изучили сиквенс-специфичность гомопоследовательностей ДНК к НЧЗ (рис. 5 А).



**Рис. 5.** Зависимость эффективности адсорбции НК на НЧЗ от последовательности НК: А – электрофоретический анализ адсорбции и Б – концентрационная зависимость связывания НЧЗ с НК с разной гомопоследовательностью.

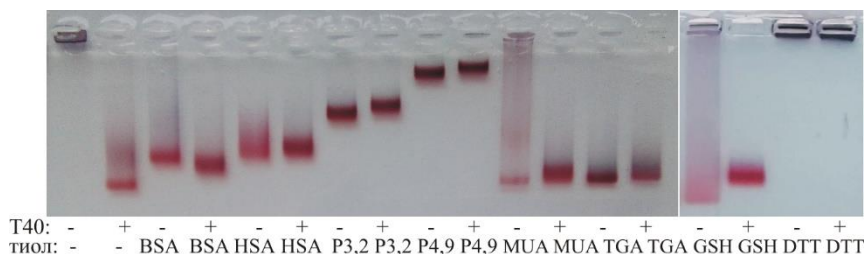
Было выявлено, что олиготимидилат и олигоаденилат имели меньшую концентрацию насыщения (6 мкМ), чем олигоценитидилат (8 мкМ) и чем олигогуанидилат (рис. 5 Б). Последний, видимо, в условиях эксперимента формировал вторичные структуры.

#### 1.4. Связывание НК с НЧЗ в условиях конкуренции с другими биомолекулами

Мы исследовали прочность олигонуклеотидного слоя на поверхности НЧЗ, инкубируя ассоциаты в избытках высоко- и

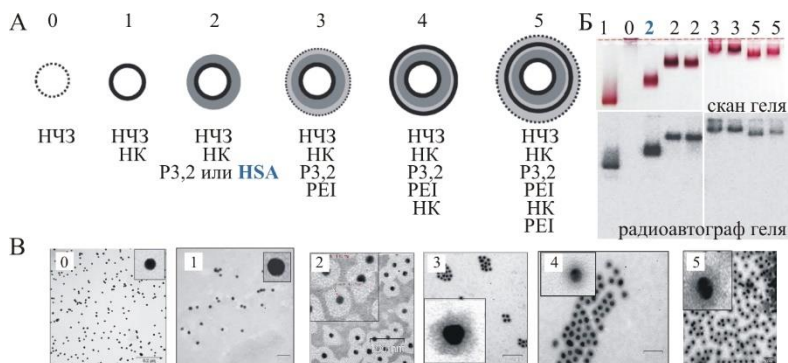


низкомолекулярных тиол-содержащих соединений, потенциально более прочно связывающихся с НЧЗ за счет образования связи Au-S (рис. 6). Наблюдали уменьшение электрофоретической подвижности НЧЗ, что связано с увеличением размера ассоциатов и может происходить, вероятно, из-за вытеснения нековалентно сорбированных НК с поверхности НЧЗ или из-за адсорбции тиол-содержащих молекул вторым слоем.



**Рис. 6.** Влияние тиол-содержащих соединений на электрофоретическую подвижность ассоциатов НЧЗ с Т40 и/или с одним из тиольных соединений (P3,2 – HS-PEG-COOH 3,2 кДа, P4,9 – HS-PEG-COOH 4,9 кДа, GSH – глутатион, MUA – меркаптоундекановая кислота, TGA –тиогликолевая кислота, DTT – дитиотреит).

Отработали методику получения многослойных ассоциатов НЧЗ, содержащих олигонуклеотиды, альбумины, полиэтиленгликоль и полиэтиленмин (PEI) вплоть до пяти слоев (рис. 7А). Сохранение олигонуклеотидного покрытия подтверждали с использованием радиоактивно меченных олигонуклеотидов (рис. 7Б). Образование многослойных ассоциатов контролировали с помощью ПЭМ (рис. 7В).

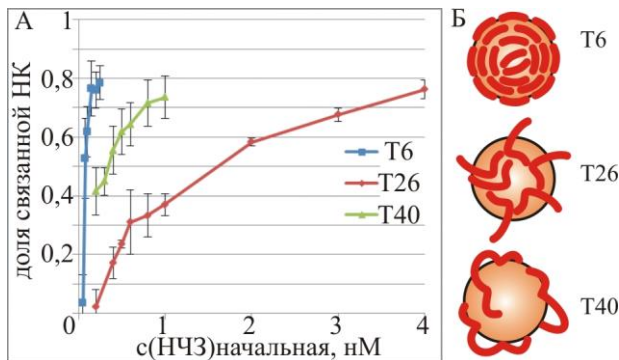


**Рис. 7.** Многослойные ассоциаты НЧЗ, НК и тиол-содержащих соединений. А – схема сборки многослойных ассоциатов (PEI – полиэтиленмин), Б – анализ подвижности многослойных ассоциатов, В – контроль образования слоев ассоциатов с помощью ПЭМ.

## 2. Расчетные оценки нековалентного связывания НК с НЧЗ

### 2.1. Константа диссоциации НК и НЧЗ

В первую очередь подтвердили установление равновесия при связывании НЧЗ с НК после инкубации в течение 30 мин при 56 °С. Далее определили равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) для ряда олигонуклеотидов (рис. 8А).



**Рис. 8.** Адсорбция олигонуклеотидов на НЧЗ. А - доля связанной ДНК при ее титровании НЧЗ, концентрация НК составляет 0,5 нМ, Б - предполагаемая модель адсорбции на НЧЗ олигонуклеотидов разной длины.

Значения  $K_D$  хорошо коррелируют со значениями концентрации насыщения, кроме Т6 (табл. 1).

**Таблица 1.** Равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ), пороговые концентрации и определенные с помощью метода динамического светорассеяния размерные характеристики ассоциатов НЧЗ-НК.

НК	$K_D$ , нМ	$C_{\text{насыщения}}$ , мкМ	d, нм	$\zeta$ -потенциал, мВ
-	-	-	$17,4 \pm 0,4$	$-33,6 \pm 2,0$
Т6	$0,10 \pm 0,04$	>10	$23,1 \pm 0,2$	$-32,5 \pm 3,9$
Т26	$1,8 \pm 0,3$	6	$31,2 \pm 0,8$	$-39,8 \pm 0,5$
А26	$6 \pm 1$	6	-	-
С26	$18 \pm 3$	8	-	-
Н26	$2 \pm 1$	6	-	-
Т40	$0,17 \pm 0,03$	4	$47,8 \pm 0,2$	$-47,3 \pm 1,5$

Видно, что для Т6, Т26, Т40 и политимидилата наблюдается возрастание гидродинамического диаметра d с 23,1 до 47,8 нм с увеличением длины НК. Достоверное различие в гидродинамическом диаметре между ассоциатами НЧЗ с Т6 и с Т26 составило 8 нм. Мы предположили, что при связывании с НЧЗ часть молекулы Т26 образует нависание или петлю рядом с поверхностью НЧЗ (рис. 8Б). Незначительное различие гидродинамического диаметра между ассоциатами НЧЗ-Т26 и НЧЗ-Т40 могло означать, что у Т26 и Т40

размеры нависаний или петель близки. Эта нависающая часть молекулы могла негативно влиять на аффинность всей молекулы из-за отталкивания от близко расположенных ионов цитрата или других молекул НК. Т.е., короткие НК, неспособные образовать нависания, могут быть более аффинными, чем длинные. НЧЗ и НЧЗ-Т6 обладали  $\zeta$ -потенциалом, близким с исходными НЧЗ (табл. 1), т.е. при замещении цитрата олигонуклеотидом отрицательный заряд и электрофоретическая подвижность НЧЗ практически не менялись, отсюда и высокая концентрация насыщения. С ростом длины олигонуклеотидов отрицательный  $\zeta$ -потенциал НЧЗ увеличивался, вероятно, за счет части молекулы, образовавшей нависание или петлю.

## 2.2. Константа Лэнгмюра и плотность покрытия НЧЗ молекулами НК

Как правило, связывание НЧЗ и НК в литературе описывают в рамках модели изотермы Лэнгмюра [Zhang, *Langmuir*, 2012]. Было показано для Т26 и Т40, что полученные нами значения констант Лэнгмюра и  $K_B$  коррелируют (табл. 2). Из данных кривых насыщения рассчитали предельно достижимые значения поверхностной плотности олигонуклеотидов на НЧЗ. При увеличении концентраций всех компонентов мы получили увеличение поверхностной плотности и значений константы Лэнгмюра, что может свидетельствовать об изменении режима связывания, например, об уменьшении части молекулы, контактирующей с НЧЗ.

**Таблица 2.** Плотность покрытия НЧЗ олигонуклеотидами в составе ассоциатов и значения константы Лэнгмюра в двух концентрационных диапазонах.

НК	покрытие, мол./НЧЗ	$K_{\text{Лэнгмюра}}$	концентрация НЧЗ
Т6	$87,6 \pm 4,8$	-	$5 \cdot 10^{-10}$ М
Т26	$12,3 \pm 1,7$	$0,042 \pm 0,003 \text{ нМ}^{-1}$	$5 \cdot 10^{-10}$ М
Т40	$5,1 \pm 0,4$	$0,28 \pm 0,03 \text{ нМ}^{-1}$	$5 \cdot 10^{-10}$ М
Т6	99,4	-	$1 \cdot 10^{-7}$ М
Т26	$31,7 \pm 1,7$	$0,46 \text{ мкМ}^{-1}$	$1 \cdot 10^{-7}$ М
Т40	$15,0 \pm 0,8$	$0,60 \text{ мкМ}^{-1}$	$1 \cdot 10^{-7}$ М

## 2.3. Связывание НК с НЧЗ в условиях конкуренции с другими биомолекулами

Далее исследовали стабильность олигонуклеотидного слоя на поверхности НЧЗ в условиях вытеснения тиол-содержащими соединениями, в том числе имитируя биологические среды (растворы альбуминов и глутатиона) (табл. 3). Объемные молекулы тиол-содержащего PEG вытесняли не более 20 % адсорбированных олигонуклеотидов, растворы альбуминов и глутатиона - от 10 до 40 %.

Большая часть олигонуклеотидов вытеснялась с поверхности НЧЗ растворами тиогликолевой (TGA), меркаптоундекановой (MUA) кислот и дитиотреита (DTT), однако эффективность вытеснения НК с помощью TGA падала втрое, если НЧЗ-НК был предварительно инкубирован с альбумином. Также получили данные о различном покрытии флуоресцентно меченным альбумином человека исходных НЧЗ ( $22,7 \pm 0,3$  мол./НЧЗ) и их ассоциатов с Т6 и Т26 ( $2,97 \pm 0,03$  и  $10,5 \pm 0,05$  мол./НЧЗ соответственно). Таким образом, мы можем обосновать предварительный вывод об адсорбции вторым слоем высокомолекулярных тиол-содержащих молекул.

**Таблица 3.** Оценка степени вытеснения адсорбированных молекул НК с поверхности НЧЗ при последующей адсорбции тиол-содержащих соединений.

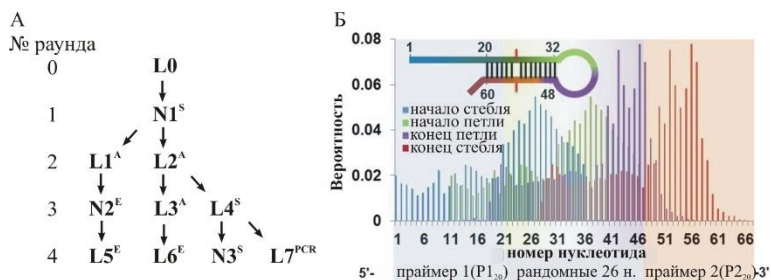
ассоциат	вытесняющий агент	% вытесненной НК
НЧЗ-Т26	HS-PEG-COOH	$10 \pm 2$
НЧЗ-Т40	HS-PEG-COOH	$17 \pm 2$
НЧЗ-Т6	Альбумины (HSA или BSA)	$10 \pm 3$
НЧЗ-Т26	Альбумины (HSA или BSA)	$20 \pm 5$
НЧЗ-Т40	Альбумины (HSA или BSA)	$40 \pm 2$
НЧЗ-Т26	глутатион	$21 \pm 5$
НЧЗ-Т40	глутатион	$14 \pm 4$
НЧЗ-Т6	тиогликолевая кислота (TGA)	$75 \pm 5$
НЧЗ-Т26	тиогликолевая кислота (TGA)	$94 \pm 4$
НЧЗ-Т40	тиогликолевая кислота (TGA)	$95 \pm 3$
НЧЗ-Т40-BSA	тиогликолевая кислота (TGA)	$33 \pm 4$
НЧЗ-Т26	меркаптоундекановая кислота (MUA)	$95 \pm 5$
НЧЗ-Т40	меркаптоундекановая кислота (MUA)	$70 \pm 9$
НЧЗ-Т26	дитиотреит (DTT)	$98 \pm 1$
НЧЗ-Т40	дитиотреит (DTT)	$99 \pm 2$

### 3. Селекция *in vitro* олигонуклеотидов, высокоаффинных к НЧЗ

#### 3.1. Условия селекции

Низкое значение  $K_D$  для смеси олигонуклеотидов, полученных после рандомизированного синтеза (N26, табл. 1), позволило предположить, что существуют гетеропоследовательности, не менее аффинные к НЧЗ, чем олигоТ. И на третьем этапе работы мы исследовали сиквенс-специфичность олигонуклеотидов к НЧЗ путем проведения селекции *in vitro*. Матрицей для селекции служила синтетическая ДНК-библиотека, содержащая 26-звенный центральный рандомизованный фрагмент и два краевых фрагмента для амплификации библиотеки методом ПЦР. Инкубацию НЧЗ с библиотекой во всех раундах проводили при  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,

чтобы создать конкуренцию, необходимую для эффективного отбора высокоаффинных последовательностей. Для улучшения селекции применили следующие приемы: стабилизацию НЧЗ с помощью полиА перед инкубацией с библиотекой (L3<sup>A</sup>, L1<sup>A</sup>) (рис. 9А), селекцию с промежуточной амплификацией (L7<sup>PCR</sup>) и выделение ассоциатов НЧЗ и наиболее аффинных НК методом гель-электрофореза (L6<sup>E</sup>, L5<sup>E</sup>). Раунд контрселекции к наночастицам серебра подтвердил специфичность селектированных библиотек. В качестве удобного экспресс-метода анализа эффективности селекции использовали электрофоретическое разделение ассоциатов НЧЗ и библиотек в агарозном геле. Ряд библиотек подвергли высокопроизводительному секвенированию MiSeq (L0, L4<sup>S</sup>, L7<sup>PCR</sup>, L3<sup>A</sup>, L6<sup>E</sup>, L1<sup>A</sup>, L5<sup>E</sup>, L2<sup>S</sup>).



**Рис. 9.** Селекция НК, высокоаффинных к НЧЗ: А - схема путей селекции, Б - распределение вероятности для начала стебля, начала петли и конца стебля на позиции в полной 66-звенной последовательности для L6, в верхней части рисунка приведена усредненная шпильчатая структура.

### 3.2. Анализ нуклеотидного состава библиотек

Секвенирование не выявило уникальных последовательностей аптамеров, поэтому проанализировали большое число коротких ДНК-мотивов (обозначены как k-нуклеотиды). Для анализа применили принципиальный компонентный анализ (PCA) и анализ частот встречаемости k-нуклеотидов. По совокупности обоих методов на уровне мононуклеотидов самыми очевидными тенденциями являлось обеднение С и обогащение Т; на уровне динуклеотидов происходило существенное обеднение G,C-богатых динуклеотидов (CC, CG и GC) и накопление А, Т, G-богатых мотивов. Содержание G, С и А плавно уменьшалось по направлению к 3'-концу, в то время как в том же направлении содержание Т увеличивалось. Наблюдения о накоплении и обеднении определенных мотивов по позициям вкупе с низкой ионной силой и низкими концентрациями всех компонентов могут указывать на формирование внутримолекулярных шпильчатых структур (рис. 9Б). Анализ возможных шпильчатых структур показал, что в процессе селекции пулы обогащались

шпильками со стеблями уменьшенной стабильности, содержащими внеспиральные нуклеотиды и нуклеотидные несоответствия.

### 3.3. Средство возможных аптамеров к НЧЗ

Мы оценили сродство к НЧЗ олигонуклеотидов, последовательности которых составили на основе отбираемости гексануклеотидов ( $k=6$ ). Значения  $K_D$  для последовательностей L2-1, L5-1, L6-1 были существенно ниже, чем для T26 и A26. Также сконструировали последовательность L6-a из наиболее неотбираемых гексануклеотидов, способную к образованию внутримолекулярных квадруплексов (определили  $K_D$  и для одноцепочечного, и для структурированного состояния L6-a). Значение  $K_D$  для одного из лидирующих мотивов TGAGAT (НК 6-1) составило  $0,14 \pm 0,02$  нМ и оказалось очень близко к значению  $K_D$  для T6. С использованием этого мотива и гибкого линкера на основе фосфодиэфира гексаэтиленгликоля (обозначен как  $\wedge$  в табл. 4) был синтезирован олигонуклеотид 6-4 со значением  $K_D$  равным  $0,41 \pm 0,09$  нМ.

**Таблица 4.** Значения констант диссоциации возможных аптамеров.

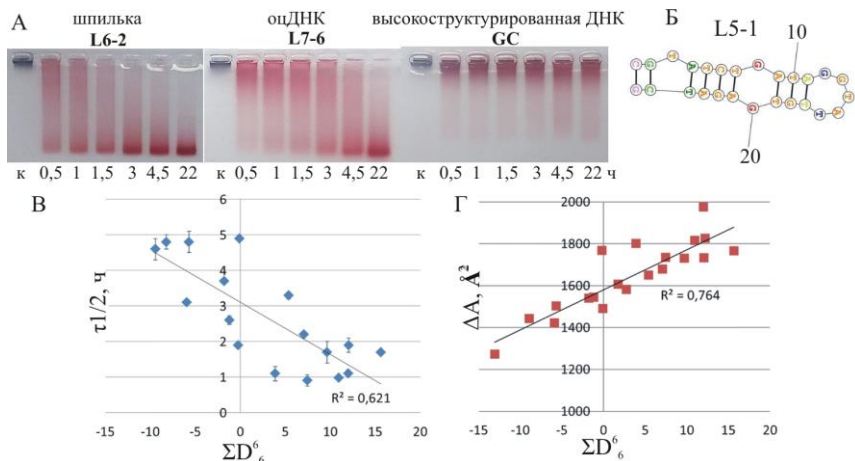
НК	последовательность	$K_D$ , нМ
L5-1	CGTATCTGATAGGTATTGTGAGATCG	$1,0 \pm 0,1$
L2-1	TATCGCGAGCGGAGTAATCTAGTGAG	$0,9 \pm 0,1$
L6-1	CAGCGGAGTAGTGATATCATGGAGTG	$1,0 \pm 0,2$
L6-a1	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC	$5 \pm 2$
L6-a2	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC	$1,9 \pm 0,1$
6-1	TGAGAT	$0,14 \pm 0,02$
6-4	TGAGAT $\wedge$ TGAGAT $\wedge$ TGAGAT $\wedge$ TGAGAT	$0,41 \pm 0,09$

### 3.4. Исследование кинетики связывания НК и НЧЗ

Изучили кинетику связывания с НЧЗ набора олигонуклеотидов длиной 26 н., обладающих разной вторичной структурой, методом агарозного электрофореза (рис. 10А). Определили время полунасыщения ( $\tau_{1/2}$ ) как количественный параметр кинетики связывания (табл. 5).

Для большинства олигонуклеотидов выявили корреляцию между значениями  $\tau_{1/2}$  и суммарного рейтинга  $\Sigma D^{\circ}$  (рис. 10В) и между значениями суммарного рейтинга и суммарного изменения гидрофобной поверхности при прерывании внутримолекулярных стэкинг-взаимодействий (рис. 10Г).

Наиболее отбираемые последовательности формировали структуры с неполностью комплементарным стеблем и G, T, A-богатой петлей (рис. 10Б). Они же обладали самой высокой скоростью адсорбции (табл. 5).



**Рис. 10.** Влияние вторичной структуры НК на связывание с НЧЗ. А – электрофоретический анализ типов кинетических профилей связывания олигонуклеотидов с различной вторичной структурой с НЧЗ, Б – предполагаемая структура одного из высокоаффинных к НЧЗ олигонуклеотидов L5-1, полученная с использованием базы данных RNAstructure, В - линейная зависимость между суммарным рейтингом  $\Sigma D_6^6$  и временем полунасыщения  $\tau_{1/2}$ , Г – линейная зависимость между суммарным рейтингом  $\Sigma D_6^6$  и суммарным изменением гидрофобной поверхности при прерывании внутримолекулярных стэкинг-взаимодействий  $\Delta A$ .

Скорость связывания с НЧЗ неструктурированных олигонуклеотидов (L6-1, L6-5, L7-5 и L7-6 и модельных T26 и C26) была существенно ниже, чем у шпильчатых олигонуклеотидов. Самой низкой оказалась скорость адсорбции наиболее структурированных олигонуклеотидов (GC и L6-a1).

**Таблица 5.** Суммарный рейтинг при селекции ( $\Sigma D_6^6$ ) и время полунасыщения ( $\tau_{1/2}$ ) для олигонуклеотидов при связывании с НЧЗ.

НК	последовательность	$\tau_{1/2}$ , ч	$\Sigma D_6^6$
L6-1	CAGCGGAGTAGTGATATCATGGAGTG	$3,3 \pm 0,1$	5,36
L6-2	ATGTAGTGTTCGATGTGTTGCTGTGT	$0,98 \pm 0,16$	10,92
L6-3	TACAGATGAGGTGTTTCGATTTGTATA	$0,91 \pm 0,12$	7,44
L6-5	GCGCGCGGGATGCTTCTAGATCAGTT	$2,6 \pm 0,1$	-1,21
L6-a2	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC нижняя полоса	$4,9 \pm 0,6$	-0,11
L6-a1	GGTGGGGGGGTGGATACGATACGTGC верхняя полоса	$8,6 \pm 1,5$	-0,11
itGCA	CGTGCAGCTTTTGCTGCACGCACTCACG	$1,9 \pm 0,3$	-0,22
tACT	CGTGAGACTGTGCAGCTTTTGCTGCACA	$1,1 \pm 0,2$	3,88

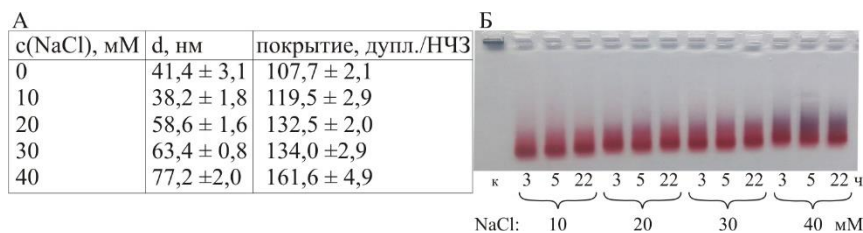
НК	последовательность	$T_{1/2}$ , ч	$\Sigma D^6$
L7-1	GCACGATGTAGTGATGTGATGTATCG	$1,9 \pm 0,2$	12,03
L7-5	AGGCAGGGCATCGCGCTGAAAGGAA	$3,1 \pm 0,4$	-5,93
L7-6	ATTAACGCGCGTAAGGGCCCTAGTGG	$4,8 \pm 0,3$	-5,70
L7-1-0	GGCACAGAGGTTGAATGTTGTGTTGT	$1,7 \pm 0,3$	9,66
L5-1	CGTATCTGATAGGTATTGTGAGATCG	$2,2 \pm 0,2$	7,05
TGT	TGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG	$1,1 \pm 0,2$	11,98
ATG	ATGATGATGATGATGATGATGATGAT	$1,7 \pm 0,2$	15,65
A26	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	$1,6 \pm 0,2$	-13,09
T26	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	$4,8 \pm 0,3$	-8,23
C26	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	$4,6 \pm 0,3$	-9,45
L2-1	TATCGCGAGCGGAGTAATCTAGTGAG	$3,7 \pm 0,4$	-1,78

Мы предположили, что высокоаффинные мотивы в петле шпильки инициируют связывание олигонуклеотида с НЧЗ, затем молекула меняет конформацию благодаря неполностью комплементарному стеблю и образует многоточечные контакты с поверхностью НЧЗ.

#### 4. Внутриклеточная доставка siРНК, адсорбированных на НЧЗ

##### 4.1. Условия для нековалентного связывания дуплексов НК с НЧЗ

На последнем этапе работы мы оптимизировали условия связывания дуплексов РНК и ДНК с НЧЗ, чтобы достичь наибольшей плотности покрытия олигонуклеотидами поверхности НЧЗ. Предварительно сформированные с добавлением NaCl дуплексы РНК добавляли к НЧЗ. Повышение концентрации NaCl от 10 до 40 мМ привело к значительному росту поверхностной плотности вплоть до 161 дуплекса/НЧЗ, что сопровождалось увеличением гидродинамического диаметра ассоциатов (рис. 11А).



**Рис. 11.** Оптимизация концентрации NaCl при получении ассоциатов НЧЗ с дцРНК: А – гидродинамический диаметр и покрытие ассоциатов НЧЗ-РНК, Б - электрофоретический анализ ассоциатов НЧЗ-РНК при концентрации NaCl от 10 мМ до 40 мМ.



Электрофоретический анализ показал, что одновременно с ростом поверхностной плотности наблюдалось нарастание слипания ассоциатов, заметное по увеличению доли синего материала в дорожках геля (рис. 11Б). Следовало соблюсти баланс между желаемой плотностью покрытия и коллоидной стабильностью ассоциатов.

#### 4.2. Различия в связывании одно- и двуцепочечных НК с НЧЗ

Образование ассоциатов НЧЗ именно с дуплексами олигонуклеотидов (дц), а не с отдельными цепями (оц) подтверждали несколькими косвенными методами (табл. 6).

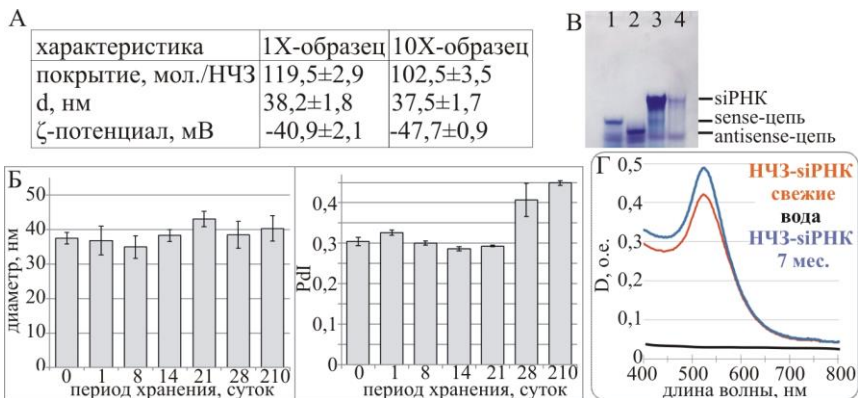
**Таблица 6.** Характеристики ассоциатов НЧЗ-оцРНК и НЧЗ-дцРНК.

характеристика	НЧЗ-оцРНК	НЧЗ-дцРНК
d, нм	30,1 ± 0,2	-39,4 ± 0,6
ζ-потенциал, мВ	38,2 ± 1,8	-40,9 ± 2,1
покрытие, мол./НЧЗ	183 ± 16	119,5 ± 2,9
τ1/2, ч-1	0,26 ± 0,03	0,50 ± 0,11
K <sub>Лэнгмюра</sub> , мкМ <sup>-1</sup>	0,19 ± 0,03	1,64 ± 0,24
электрофоретическая подвижность	1	0,89 ± 0,03

Ассоциаты НЧЗ с дцРНК имели достоверно больший гидродинамический диаметр, чем ассоциаты НЧЗ с отдельными цепями, что может указывать на разный режим связывания. Кинетика связывания и плотность покрытия дцРНК и оцРНК на НЧЗ отличалась, как и относительная электрофоретическая подвижность ассоциатов в 4 % геле на основе MetaPhor® агарозы.

#### 4.3. Масштабирование сборки ассоциатов НЧЗ и дцНК и исследование их стабильности при хранении

Для исследования биологического потенциала ассоциатов НЧЗ и олигонуклеотидов необходимы значительные их количества. Исследовали возможность увеличения реакционного объема при получении ассоциатов НЧЗ с siРНК и стабильность готовых ассоциатов при длительном хранении. Ассоциаты, приготовленные в однократном и десятикратно увеличенном реакционном объеме, имели очень близкие значения гидродинамического диаметра и ζ-потенциала. Увеличение реакционного объема в 10 раз при получении нековалентных ассоциатов практически не оказало влияния на плотность покрытия поверхности НЧЗ дуплексами НК: значение поверхностной плотности отличалось не более, чем на 16 % (рис. 12А).



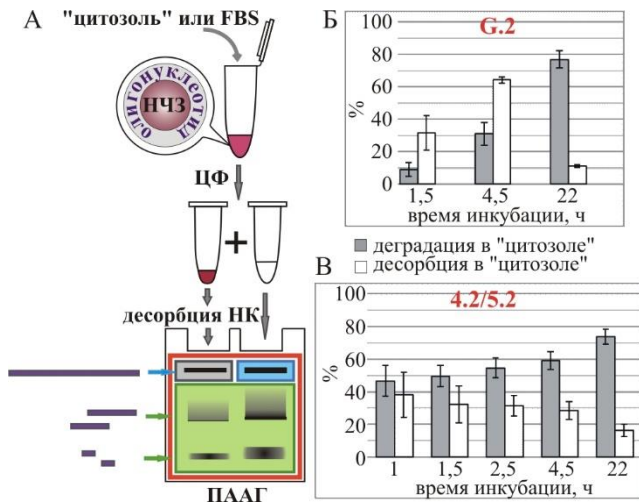
**Рис. 12.** Исследование ассоциатов НЧЗ-siРНК при масштабировании синтеза и хранения: А - характеристика ассоциатов НЧЗ с siРНК, Б - гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности ассоциатов, приготовленных в десятикратном объеме, на разных сроках хранения, В - электрофоретический анализ РНК, десорбированной с поверхности НЧЗ после 7 месяцев хранения ассоциатов (дорожка 4) в 15 % нативном ПААГ (контроли подвижности: дорожка 1 –sense-цепь РНК, дорожка 2 – antisense-цепь РНК, дорожка 3 – siРНК, Г - спектры оптического поглощения ассоциатов НЧЗ-дцРНК, свежеприготовленных и после 7 мес. хранения.

Хранение в течение 21 суток практически не повлияло на размер ассоциатов и индекс полидисперсности (рис. 12Б). После хранения в течение 7 месяцев диаметр ассоциатов по-прежнему составлял 40 нм, но индекс полидисперсности увеличился до 0,449. Видно (рис. 12В), что нуклеотидное покрытие было устойчиво к хранению в течение 7 месяцев, причем обе цепи сохранялись на НЧЗ. По спектрам оптического поглощения НЧЗ сохраняли коллоидную стабильность (рис. 12Г).

#### 4.4. Исследование устойчивости НК в составе нековалентных ассоциатов с НЧЗ к деградации в растворах FBS и «цитозоля»

Далее мы исследовали деградацию олигонуклеотидов и степень десорбции полноразмерных олигонуклеотидов с поверхности НЧЗ в биологических средах. Использовали бактериальный «цитозоль», полученный из *E.coli* без их лизиса, и раствор FBS. Эти растворы содержали сравнимое количество белка и обладали фосфатазной и нуклеазной активностями. После инкубации в «цитозоле» или растворе FBS НЧЗ отделяли центрифугированием от супернатанта, разделяя каждый образец на две части. НЧЗ обрабатывали 50 мМ раствором ДТТ для десорбции олигонуклеотидов с поверхности (рис. 13А). Все образцы олигонуклеотидов подвергали электрофоретическому разделению в ПААГ и затем рассчитывали степень десорбции полноразмерных молекул и степень деградации олигонуклеотидов, принимая за 100 % количество

молекул олигонуклеотидов, сорбированных на НЧЗ до инкубации в FBS или «цитозоле».

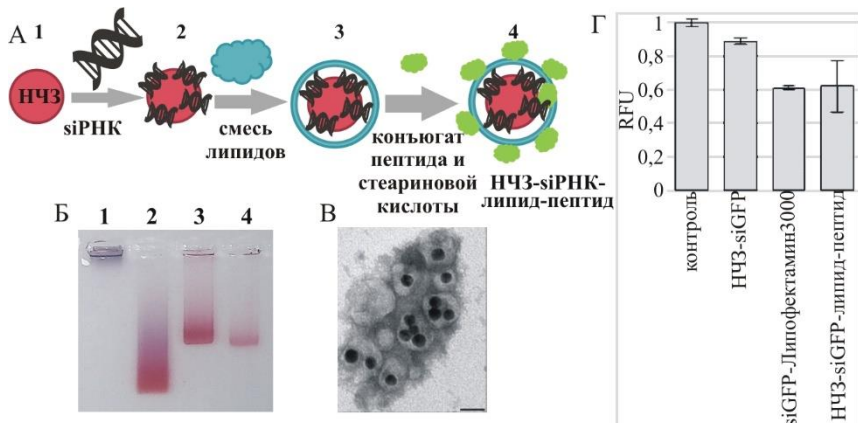


**Рис. 13.** Исследование устойчивости ассоциатов НЧЗ-НК в «цитозоле» или FBS: А – схема эксперимента, Б – степень деградации и десорбции оДНК G.2 в «цитозоле», В – степень деградации и десорбции дцРНК 4.2/5.2 в «цитозоле».

Содержание полноразмерных молекул олигонуклеотидов в растворе менялось в результате двух процессов: деградации активными компонентами растворов и высвобождения полноразмерных молекул с поверхности НЧЗ. Для защиты нуклеотидного материала от разрушения нуклеазами в молекулы олигонуклеотидов ввели по две РG-модификации вблизи 3'-конца олигонуклеотида. Модифицированный таким образом олигонуклеотид G.2 в составе ассоциата с НЧЗ демонстрировал высокую устойчивость к деградации: через 4,5 ч инкубации с «цитозолом» деградировал только 31 % G.2 (рис. 13Б). Модифицированные и нативные ДНК в составе ассоциатов после 22 ч инкубации с «цитозолом» деградировали в сходной степени на 75 – 80%. Однако в начальном периоде инкубации модифицированные ДНК были в несколько раз более устойчивы, чем нативные ДНК. Скорость высвобождения модифицированной ДНК превышала скорость ее деградации: доля полноразмерной G.2 в растворе возрастала с 32 до 64 % после 1,5 и 4,5 ч инкубации соответственно. Анализ деградации и десорбции модифицированных дуплексов РНК в составе ассоциатов с НЧЗ (рис. 13В) показал, что за 4,5 ч уровень деградации РНК составил 59 %, а за 22 ч - 74 %, что существенно меньше, чем степень деградации нативного дуплекса 4/5 (92 %). Доля полноразмерных РНК дуплексов 4.2/5.2 в растворе поддерживалась на постоянном уровне от 30 до 40 % вплоть до 4,5 ч инкубации, что может обеспечить биологический эффект РНК.

#### 4.5. Многослойные конструкции на основе НЧЗ для доставки siРНК в клетки

Второй подход для защиты терапевтических олигонуклеотидов от разрушения во внутриклеточной среде заключался в покрытии ассоциатов НЧЗ-siРНК липидной оболочкой с добавлением аргинин-содержащего пептида (рис. 14А).



**Рис. 14.** Биологическая активность многослойных ассоциатов НЧЗ-siGFP-липид-пептид: А - схема сборки многослойных ассоциатов НЧЗ-siGFP-липид-пептид, Б - анализ ассоциатов электрофорезом (1 - НЧЗ, 2 - НЧЗ-siGFP, 3 - НЧЗ-siGFP-липид, 4 - НЧЗ-siGFP-липид-пептид), В - ПЭМ-анализ ассоциатов НЧЗ-siGFP-липид-пептид, Г - подавление синтеза белка GFP siРНК, доставленной в составе НЧЗ-siGFP-липид-пептид и с помощью Липофектамина 3000, в клетках НЕК-Phoenix; гистограмма построена с использованием нормализованных средних значений флуоресценции клеток (RFU образца/RFU контроля) после трансфекции; в каждой выборке насчитывали более 10000 событий, средние значения получены по трем независимым экспериментам.

Сформированные многослойные ассоциаты имели гидродинамический диаметр 127 нм и  $\zeta$ -потенциал – 22 мВ. Мы зафиксировали уменьшение электрофоретической подвижности многослойных ассоциатов на всех этапах сборки (рис. 14Б). Полученные ассоциаты были охарактеризованы также ПЭМ (рис. 14В). Методом проточной цитофлуориметрии была исследована эффективность подавления синтеза белка GFP в клетках НЕК-Phoenix ассоциатами НЧЗ-siGFP-липид-пептид (рис. 14Г). Видно, что уровень флуоресцентного сигнала снизился до 38 %. Такой же эффект наблюдался при трансфекции с использованием Липофектамина 3000.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан способ создания нековалентных ассоциатов наночастиц золота (НЧЗ) и олигонуклеотидов (НК), заключающийся в инкубации тиол-несодержащих НК и сферических цитрат-стабилизированных НЧЗ без изменения состава коллоидного раствора последних. Способ обеспечивает:

- возможность оценки сродства НК к НЧЗ методом электрофоретического разделения в агарозном геле при титровании НЧЗ олигонуклеотидом;
- высокую стабильность олигонуклеотидного покрытия и его контролируемую загрузку на поверхность НЧЗ в зависимости от длины, последовательности НК (до 150 молекул одноцепочечного гексануклеотида или 160 дуплексов длиной 21 пар оснований на одну НЧЗ);
- возможность декорирования нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК белками или полиэтиленгликолем для применения в биологических средах.

2. Изучено влияние последовательности и структуры одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов на взаимодействие с наночастицами золота. Установлено, что:

- аффинность гомеолигонуклеотидов равной длины (26-меров) изменяется в ряду  $T > A >> C$  (равновесные константы диссоциации  $K_D$  составили  $1,8 \pm 0,3$ ,  $6 \pm 1$ , и  $18 \pm 3$  нМ соответственно);
- реализация внутримолекулярного стэкинг-взаимодействия и комплементационные взаимодействия между азотистыми основаниями НК негативно сказываются на сродстве НК к НЧЗ;
- G,T,A-богатые олигонуклеотиды, не имеющие стабильной вторичной структуры, проявляют повышенную аффинность к НЧЗ.

3. Предложен механизм взаимодействия олигонуклеотидов с НЧЗ, предполагающий первоначальное связывание конформационно подвижных азотистых оснований в структуре олигомера с последующей реорганизацией цепи последнего для обеспечения множественных контактов, преимущественно гидрофобных, между НК и поверхностью НЧЗ.

4. Показана возможность масштабирования реакционного объема при получении ассоциатов НЧЗ-НК и их коллоидная стабильность во время длительного хранения (до 7 мес.) без существенных изменений олигонуклеотидного покрытия.

5. Исследован потенциал нековалентных ассоциатов НЧЗ-НК для внутриклеточной доставки терапевтических НК:

- показана пролонгированная десорбция полноразмерных олигорибонуклеотидов из ассоциатов НЧЗ-НК при выдерживании НЧЗ-НК в биологических средах;
- продемонстрирована стабильность НК, содержащих на 3'-конце два фосфорилгуанидиновых остатка, к действию нуклеаз, входящих в состав сыворотки FBS и бактериального цитозоля;
- показано эффективное подавление гена GFP с помощью многослойной конструкции НЧЗ-siРНК-липид.

**Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. Шашкова В. В., Епанчинцева А.В., Воробьев П.Е., Разум К.В., Рябчикова Е.И., Пышный Д.В., Пышная И.А. Многослойные ассоциаты на основе олигонуклеотидов и наночастиц золота // Биоорган. Химия. – 2017. – Т. 43. - С. 75–82.
2. **Epanchintseva A.**, Vorobjev P., Pyshnyi D., Pyshnaya I. Fast and Strong Adsorption of Native Oligonucleotides on Citrate-Coated Gold Nanoparticles // *Langmuir*. – 2018. - V. 34. - P. 164-172.
3. **Epanchintseva A.**, Dolodoev A., Grigor'eva A., Chelobanov B., Pyshnyi D., Ryabchikova E., Pyshnaya I. Non-covalent binding of nucleic acids with gold nanoparticles provides their stability and effective desorption in environment mimicking biological media // *Nanotechnology*. – 2018. – V. 29. – P. 355601.
4. Poletaeva J., Dovydenko I., **Epanchintseva A.**, Korchagina K., Pyshnyi D., Apartsin E., Ryabchikova E., Pyshnaya I. Non-covalent associates of siRNAs and AuNPs enveloped with lipid layer and doped with amphiphilic peptide for efficient siRNA delivery // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – P. 2096.
5. Vorobjev P., **Epanchintseva A.**, Lomzov A., Tupikin A., Kabilov M., Pyshnaya I., Pyshnyi D. DNA binding to gold nanoparticles through the prism of molecular selection: sequence–affinity relation // *Langmuir*. – 2019. – V. 35. – P. 7916–7928.
6. **Epanchintseva A.**, Poletaeva J., Pyshnyi D., Ryabchikova E., Pyshnaya I. Long-term stability and scale-up of noncovalently bound gold nanoparticle-siRNA suspensions // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2019. – V. 10. – P. 2568–2578.