

Химический факультет

На правах рукописи

Ажибек Дулат Мейирбекович

ИНГИБИРОВАНИЕ ТЕЛОМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук**

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

Донцова Ольга Анатольевна, доктор химических наук, член-корр. Российской академии наук, профессор кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Зверева Мария Эмильевна, кандидат химических наук, доцент кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Киселев Федор Львович, доктор биологических наук, профессор, член-корр. Российской академии наук, заведующий лабораторией лаборатории молекулярной биологии вирусов, отдела трансформирующих генов опухолей, НИИ канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина".

Смирнов Иван Витальевич, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории биокатализа отдела пептидно-белковых технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук.

Защита состоится 24 февраля 2015 года в 16.00 на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, Лабораторный корпус «А», аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова и на сайте химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (по адресу <http://www.chem.msu.ru/rus/theses/2014/2014-12-11-azhibek/>).

Автореферат разослан ___ января 2015 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук,
доцент

Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Современный подход к борьбе с онкологическими заболеваниями – это разработка целевой или таргетной терапии. Механизм целевой терапии заключается в ингибировании, блокировании или деградации молекул (ферменты/белки, РНК), необходимых для развития и/или жизнедеятельности опухолевых клеток. Такие молекулы называются мишенями. Спектр возможных мишеней и разрабатываемых к ним направленных препаратов достаточно широк и зависит от типа опухолевых клеток. Однако из-за гетерогенности опухоли в ней могут присутствовать опухолевые клетки, содержащие разные мишени, поэтому наибольший интерес представляет поиск мишеней, встречающихся в различных типах опухолевых клеток. Чем универсальнее мишень, тем больше типов опухолевых клеток будет подвергаться терапии. Одной из таких мишеней является теломераза. Теломераза – комплексный фермент, состоящий из РНК и белка. Этот фермент необходим для неограниченного числа делений клетки и активируется в 80-90% типов опухолевых клеток.

Концы хромосом млекопитающих состоят из повторяющихся последовательностей TTAGGG, взаимодействующих со специфическими белками. Такие концевые ДНК-белковые структуры называются теломерами. При делении клетки длина теломер сокращается за счет недорепликации концов хромосом. Сокращение длины теломер до критического уровня приводит к активации программируемой гибели клетки. Основная функция теломеразы заключается в удлинении/поддержании длины теломер за счет синтеза повторяющейся последовательности ДНК на концах хромосом.

Выключение работы теломеразы приводит к сокращению количества теломерных повторов на концах хромосом с каждым делением опухолевой клетки, что приводит к последующей гибели клетки.

Целью данной работы был дизайн новых химерных ингибиторов теломеразы олигонуклеотидной природы, изучение влияния их структуры на ингибирующую способность и определение стадии биогенеза или работы теломеразы, подвергающейся ингибированию. Для достижения поставленных целей необходимо было разработать адекватную систему для детекции ингибирования теломеразы.

Научная новизна и практическая значимость работы. В ходе работы был оптимизирован количественный метод измерения теломеразной активности для поиска потенциальных ингибиторов теломеразы различной природы. Решена проблема влияния исследуемых веществ на полимеразную цепную реакцию, которая используется для усиления сигнала при измерении теломеразной активности. Разработанный метод был

использован для оценки ингибирующей способности различных низкомолекулярных соединений и олигонуклеотидов. При тестировании олигонуклеотидов лучшую способностью ингибировать теломеразу в клетке проявили химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух последовательностей, комплементарных теломеразной РНК, и соединенных не-нуклеотидным линкером. Показано, что химерные олигонуклеотиды влияют на работу теломеразы в системе *in vitro* и эффективно блокируют сборку активного теломеразного комплекса в клетке. Таким образом, экспериментально продемонстрирована эффективность подхода к ингибированию теломеразы за счет блокирования сборки активного комплекса. Такие олигонуклеотиды могут стать основой для разработки новых более эффективных противоопухолевых препаратов. Так, способность ингибировать теломеразу в клетке наиболее эффективного химерного олигонуклеотида превышает такую способность для олигонуклеотида с последовательностью препарата Иметелстата, находящегося во второй фазе клинических испытаний, почти в 30 раз.

При анализе ингибирующей способности химерных олигонуклеотидов *in vitro* еще раз было подтверждено, что теломераза является димером. Так, димеризация способствует ингибированию теломеразы химерным олигонуклеотидом (М*с3М), предназначенным для взаимодействия с двумя молекулами теломеразной РНК. Это фундаментальное свойство теломеразы человека в дальнейшем также может быть использовано для разработки более эффективных и селективных ингибиторов теломеразы.

Апробация работы. Материалы диссертации обсуждали на семинарах лаборатории химии рибонуклеопротеидов кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. Ломоносова; докладывали на конференциях: XVI Международная Научная Конференция для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2009» МГУ имени М.В.Ломоносова. Москва, Россия, апрель 11-14, 2009; XVII Международная Научная Конференция для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2010» МГУ имени М.В.Ломоносова. Москва, Россия, апрель 8-12, 2010; 38-ая Международная конференция европейского биохимического общества FEBS. Санкт-Петербург, Россия, июль 6-11, 2013.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы, выводы, список литературы и приложение. Материал иллюстрирован 40 рисунками и 9 таблицами. Библиографический указатель включает 173 цитированные работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Известно, что теломераза является сложным РНК-белковым комплексом, и для ее активации необходим процесс сборки этого комплекса в клетке. Основной целью данной работы была разработка нового подхода для ингибирования теломеразы, основанного на блокировании сборки теломеразного комплекса. Для скрининга ингибирующей способности веществ необходим надежный метод тестирования. Из-за низкой концентрации теломеразы в клетке (100 молекул на 1 клетку) определение компонентов теломеразы и ее активности становится сложным процессом.

Самым надежным и информативным для исследования теломеразы является прямой метод детекции теломеразной активности (ПТА). Этот метод основан на удлинении теломер-подобного олигонуклеотида теломеразой в клеточном экстракте в присутствии радиоактивно меченого нуклеотида, который включается в теломерный повтор. Результат удлинения олигонуклеотида теломеразой называют «продукт удлинения». Далее «продукт удлинения» анализируют электрофорезом. У метода ПТА очень низкая чувствительность, что требует большого количества теломеразы и радиоактивного материала и делает невозможным его использование в обычных исследовательских лабораториях. Самым доступным и простым методом для определения ингибирования теломеразы является метод амплификации теломерных повторов (ТРАП), включающий в себя дополнительный шаг — амплификацию «продукта удлинения» с помощью ПЦР. Этот дополнительный шаг вводит ограничения на использование этого метода при тестировании потенциальных ингибиторов теломеразы.

1. Разработка метода детекции теломеразной активности

Так как основной целью работы было исследование новых химерных ингибиторов теломеразы олигонуклеотидной природы, стабильность которых зависит от компонентов клеточного экстракта, на первом этапе был разработан способ дополнительной очистки клеточного экстракта и концентрирования в нем теломеразы. Для оптимизации метода измерения теломеразной активности за основу был взят метод ТРАП. Необходимо было решить проблему ингибирования соединениями шага амплификации сигнала.

При поиске ингибиторов теломеразы методом ТРАП очистка «продукта удлинения» перед проведением ПЦР абсолютно необходима, так как ингибиторы теломеразы обычно ингибируют и ПЦР, что искажает полученные результаты. Мы планировали исследование ингибирования теломеразы олигонуклеотидами, которые по своей природе одинаковы с «продуктом удлинения». Соответственно очистка «продукта удлинения» от олигонуклеотида невозможна. Чтобы решить эту проблему, мы добавили этап разбавления «продукта удлинения» перед ПЦР. При разбавлении можно снизить

концентрацию ингибиторов до предела, когда они перестают влиять на ПЦР. При этом в ПЦР «продукты удлинения» амплифицируются, что позволяет измерить ингибирование теломеразы (рис.1А).

Для сравнения способности веществ ингибировать теломеразу необходимо определить IC_{50} . IC_{50} – это концентрация ингибитора, при которой активность теломеразы составляет 50% от исходной. Для его расчетов необходим количественный метод. В связи с этим был использован ТРАП с количественным ПЦР на шаге амплификации сигнала, а именно ПЦР в реальном времени (RQ-ТРАП). IC_{50} рассчитывали по логарифмической кривой ингибирования теломеразы. Для этого измеряли и строили зависимость относительной теломеразной активности от разной концентрации ингибитора (рис.1А, сплошная линия). Логарифмическая кривая ингибирования состоит из трех частей: нижнее плато, верхнее плато и экспоненциальная часть. Для расчета IC_{50} ингибирования теломеразы выявляли верхнее и нижнее плато. Чтобы ингибирование ПЦР (рис.1А, прерывистая линия) не влияло на результат ингибирования теломеразы, верхнее плато кривой ингибирования ПЦР должно пересекаться с экспоненциальной частью и верхним плато ингибирования теломеразы.

При проверке ингибирования ПЦР тестируемое вещество было добавлено после теломеразной реакции перед разбавлением и до проведения ПЦР (рис.1А, прерывистая линия, до разбавления). После разбавления «продукта удлинения» кривая ингибирования смещается (рис.1А, прерывистая линия, после разбавления). Если сигнал будет таким же, как и в отсутствие ингибитора, то это означает, что ингибитор не влияет на ПЦР. Для оценки ингибирования ПЦР олигонуклеотидами в качестве модельных олигонуклеотидов мы решили использовать РНК олигонуклеотиды NuG2R (5'-UUAGGGUUAGGG-NH₂-3') и NuG4R (5'-(UUAGGG)₄-NH₂-3'), имеющие теломерные последовательности и максимально схожие с теломерным продуктом. Из литературных данных известно, что такие олигонуклеотиды ингибируют теломеразу, т.к. являются аналогами TERRA – природного ингибитора теломераз. Использование разбавления «продукта удлинения» в 40 раз оказалось достаточным для элиминирования ингибирования ПЦР для РНК олигонуклеотидов (рис. 1Б). В случае NuG4R видно, что при увеличении концентрации олигонуклеотид начинает ингибировать ПЦР уже в отсутствие теломеразного продукта (рис.1Б).

Таким образом, измерить ингибирование теломеразы олигонуклеотидами, влияющим на ПЦР, без выделения «продукта удлинения» можно с помощью введения дополнительного шага разбавления до ПЦР.

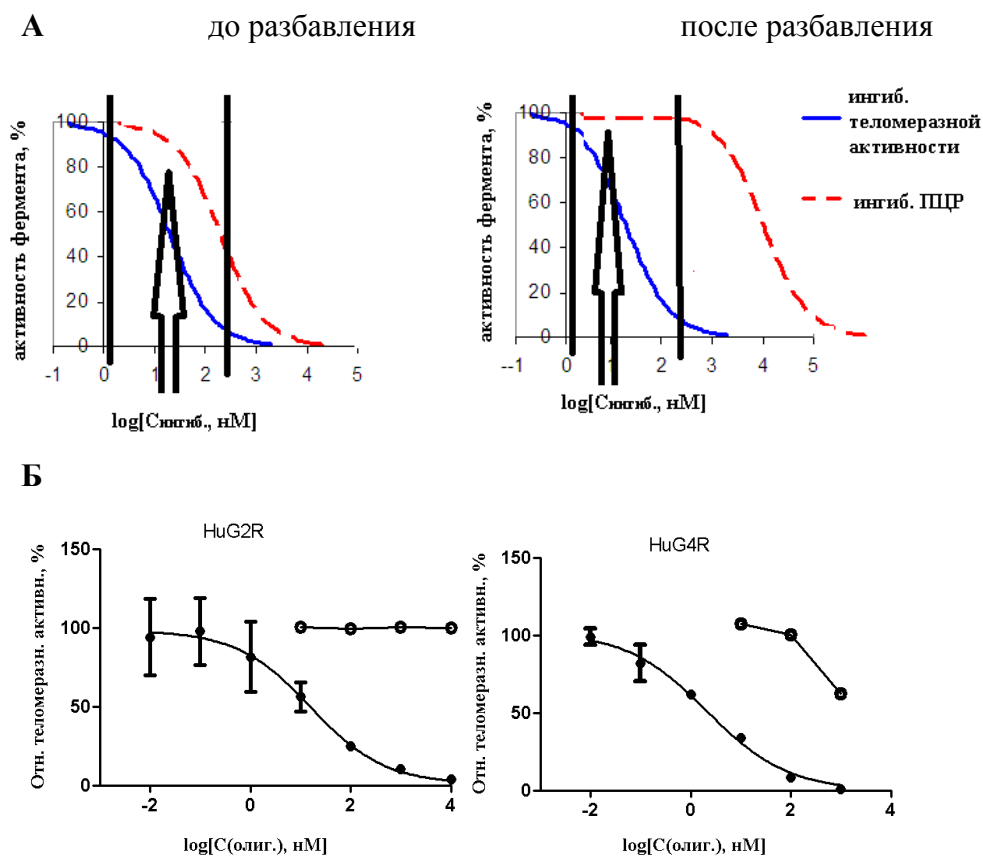


Рис.1. Исключение влияния ингибирования ПЦР теломеразными ингибиторами в методе ТРАП измерения теломеразной активности за счет разбавления продукта удлинения теломеразы. А – схематическое представление графика ингибирования теломеразы до и после разбавления теломеразного продукта перед ПЦР. Б – графики ингибирования теломеразы олигонуклеотидами HuG2R и HuG4R, полученные на основе данных методом RQ-ТРАП с разбавлением. Ингибирование теломеразы отмечено как (•), ингибирование ПЦР как (○).

Недостаток использования разбавления «продукта удлинения» для исключения ингибирования ПЦР в методе ТРАП исследуемыми веществами заключается в том, что при сильном разведении концентрация теломеразного продукта становится меньше предела чувствительности ПЦР. Для снятия такого ограничения необходимо было повысить концентрацию теломеразного продукта. Для этого необходимо было повысить концентрацию теломеразы в теломеразном экстракте. Это возможно за счет увеличения экспрессии теломеразы исходно в клетке перед получением теломеразного экстракта. На данный момент в мире для увеличения экспрессии теломеразы в основном используется генно-инженерная конструкция, созданная в лаборатории профессора Лингнера. В этой конструкции два компонента теломеразы, hTR и hTERT, синтезируются с двух разных плазмид и временно экспрессируются в клетках НЕК293Т. Основная проблема при временной экспрессии – уменьшение транскрипции трансфецированных плазмид в клетке во времени. Один из способов борьбы с уменьшением транскрипции генов на плаزمиде, внесенных в клетку, является эписомальная репликация плазмиды.

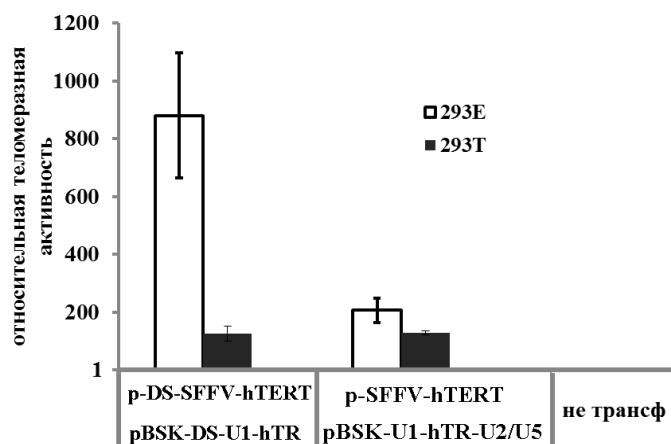


Рис.2. Экспрессия теломеразы в сублиниях клеток HEK293: HEK293E – отмечены пустыми столбцами, HEK293T – отмечены темными столбцами. По оси абсцисс приведены названия плазмид, трансфицированных в клетки. Относительная теломеразная активность приведена по отношению к не трансфицированным клеткам.

Известно, что ДНК-содержащие вирусы умеют реплицироваться в клетке. Такие вирусы кодирует белок, который специфически связывается с ориджином репликации вируса и привлекает репликативную машину клетки. Для экспрессии теломеразы мы решили использовать клетки HEK293E, содержащие антиген вируса EBV (Epstein Baar virus) под названием EBNA-1. Ориджин репликации этого вируса работает

синхронно с делением клетки, поэтому репликация плазмиды не конкурирует с его транскрипцией. Размер ориджина EBV большой (~2000 п.о.), он содержит два основных элемента FR и DS. Есть данные о том, что элемент DS (200 п.о.) достаточен для репликации плазмиды. Мы поместили элемент DS в плазмиды pBSK-U1-hTR-U2/U5 и p-SFFV-hTERT, которые транзитарно экспрессируют компоненты теломеразы. Полученные конструкции, умеющие эписомально реплицироваться, названы pBSK-DS-U1-hTR и p-DS-SFFV-hTERT. В результате экспрессии этих конструкций в клетках HEK293E активность теломеразы увеличилась в 3-4 раза (рис.2). В качестве контроля плазмиды трансфицировали в другую сублинию клеток 293T, не имеющих EBNA-1 белка. Видно, что элемент DS не работает в этих клетках.

Адекватность метода RQ-ТРАП с разбавлением по отношению к литературным данным проверили, используя соединения с известным IC_{50} . Для этого выбрали известное низкомолекулярное соединение VIBR1532, которое часто используется в качестве контрольного ингибитора теломеразы. Полученная для этого соединения величина IC_{50} составила $0,21 \pm 0,04$ мкМ. Эта величина IC_{50} при сравнении с литературными данными соответствует результатам измерения методом ПТА ($IC_{50} \sim 0,1$ мкМ). Однако, VIBR1532 не ингибирует ПЦР. Следующим этапом стала проверка подхода на соединениях, ингибирующих ПЦР.

«Продукт удлинения» теломеразой содержит теломерные последовательности, которые могут образовывать G4-квадруплексы. Известно, что низкомолекулярные вещества, взаимодействующие с и стабилизирующие G4-квадруплексы и называемые G4-лигандами, ингибируют ПЦР и являются ингибиторами теломеразы. Нами были

проверены известные соединения LCTA-1120 и LCTA-1581, являющиеся антрахиноновыми производными, которые ингибируют теломеразу (рис.3). IC_{50} для них: $0,69 \pm 0,24$ и $0,92 \pm 0,45$, соответственно. Это соответствует литературными данным.

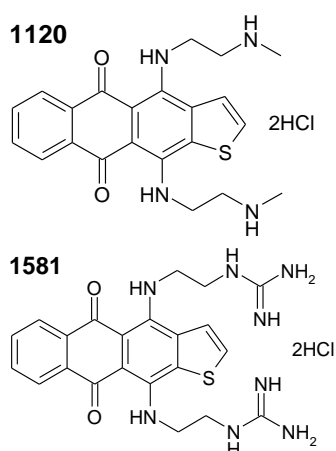


Рис.3. Структурные формулы LCTA-1120 и LCTA-1581.

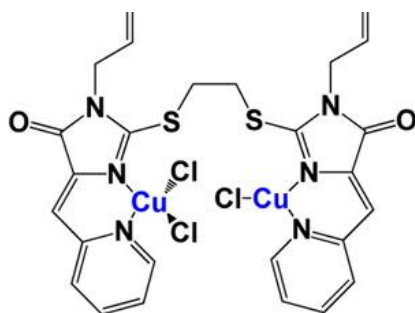


Рис.4. Структурная формула 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он в комплекса с медью.

Другие производные этих соединений, которые были синтезированы в лаборатории Н.С.Ильинского с целью улучшения способности таких соединений взаимодействовать с G4-квадруплексами, также были проверены на способность ингибировать теломеразу. Большинство соединений ингибирует ПЦР в пределах концентрации 0,05-0,15 мкМ, тогда как теломеразу в 4-7 раза слабее. Оказалось, что модификация боковых групп не сильно влияет на способность ингибировать теломеразу.

Разработанный нами метод был дополнительно протестирован на металлоорганическом соединении, моделирующем квадруплекс, параллельно с методом ПТА. Для изучения медных комплексов на кафедре органической химии химического факультета МГУ в лаборатории профессора Зыка Н.В. в группе Мажуги А.С. было синтезировано новое соединение 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он (рис.4), которое образует комплекс с двумя атомами меди, имеющих две разных степени окисления (рис.4).

Этот комплекс (рис.4) ингибировал теломеразу с IC_{50} 13 ± 2 мкМ по нашему методу и с IC_{50} 20 мкМ по методу ПТА. В методах используются разные солевые условия в теломеразной реакции, что поставило вопрос о степени стабильности комплекса в разных солевых условиях. Для этого решено было проверить ингибирует ли теломеразу органическое соединение и/или двухвалентная медь по отдельности вне комплекса. Соединение без меди ингибирует теломеразу на том же уровне, что и комплекс ($IC=12 \pm 6$ мкМ). Двухвалентная медь также ингибирует теломеразу с IC_{50} равной 9 ± 1 мкМ. Можно предположить, что расположение меди в комплексе критически не влияет на ингибирующую способность соединения. Кроме того, полученные данные говорят о необходимости подтверждения ингибирующей способности соединений, выбранных по результатам RQ-ТРАП, методом прямого измерения теломеразной активности.

2. Разработка новых подходов к ингибированию теломеразы

2.1. Дизайн химерных бифункциональных олигонуклеотидов

Основной целью нашей работы была разработка новых подходов к ингибированию теломеразы. Известно, что теломеразная РНК имеет два домена, необходимые для работы теломеразы: псевдоузел и CR4/CR5 (рис.5А). Эти два домена могут сближаться друг с другом в теломеразном комплексе. Кроме того известно, что в условиях *in vitro* теломераза является димером. В связи с этим мы решили использовать химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух олигонуклеотидных частей, соединенных ненуклеотидным линкером. Такой химерный олигонуклеотид связывался бы одновременно с двумя участками hTR внутримолекулярно и/или межмолекулярно, тем самым, возможно, нарушая структуру или динамику hTR (и/или теломеразного комплекса). Это привело бы к ингибированию теломеразы.

Химерные олигонуклеотиды были синтезированы Зацепиным Т.С. и состояли из следующих частей: олигонуклеотид М – комплементарен к матричной части (область 46-65); J – комплементарен к области псевдоузла 152-168; N – комплементарен к CR4/CR5 домену hTR (рис.5). Также олигонуклеотид N имеет дополнительные 3 нуклеотида на 5'-конце, предоставляющие возможность отделять два соединенных комплементарных участка в таких олигонуклеотидах, как MN или JN. Во избежание деградации нуклеазами и элонгации полимеразы все олигонуклеотиды были 2'-ОМе модифицированы и защищены с 3'-конца б-аминогексанолом (-R-NH₂ в рис.5Б).

Химерные олигонуклеотиды были соединены 3'-5', или 3'-3', или 5'-5' концами через 1,3-пропандиоловый линкер (с3) (Рис. 5Б). Если М, N, J олигонуклеотиды использовались индивидуально, то с3 линкер был добавлен на 5'-конец, а в случае с М также и на 3'-конец (табл.1). Олигонуклеотид G (Рис. 5А) (hTR область 42-54), который имеет последовательность, идентичную с GRN163L и связывается с матричной частью hTR, несет модификации, описанные выше, был использован в качестве контроля для ингибирования теломеразы. GRN163L (Иметелстат) является модифицированным олигонуклеотидом, разработанным компанией Geron. GRN163L проходит II стадию клинических испытаний.

Для каждого олигонуклеотида была измерена теломеразная активность как *in vitro*, так и в условиях «*in vivo*».

Под термином «in vivo» подразумевается культивирование клеток в присутствии олигонуклеотидов, их влияние на теломеразу и ее компоненты в клетке, последующее выделение теломеразного экстракта из таких клеток и проведение тестирования

теломеразной активности в этом экстракте разработанным методом RQ-ТРАП.

2.2. Ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами in vitro

Для каждого олигонуклеотида было проведено параллельное тестирование влияния на ПЦР реакцию для определения степени необходимого разбавления при измерении влияния на теломеразную активность in vitro.

Олигонуклеотиды М и J по отдельности достаточно хорошо ингибируют теломеразу in vitro (IC₅₀ составили 100 нМ и 19 нМ, соответственно). Как и предполагалось,

олигонуклеотид G показал лучшее ингибирование, чем М (IC₅₀ 11нМ) (табл. 1).

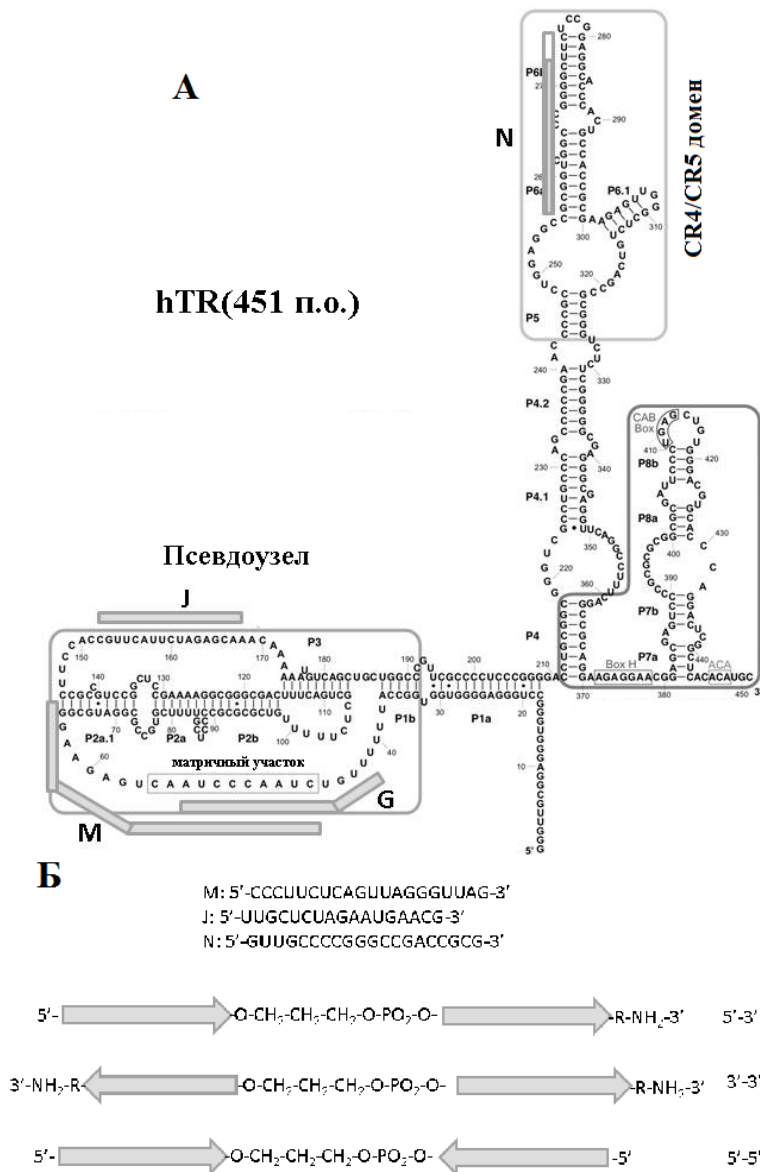


Рис. 5. А. Положение олигонуклеотидных частей химер на вторичной структуре hTR. Олигонуклеотиды М, J, G и N окрашены в серый цвет. Б. Схематическое представление химер. R-NH₂ – 6-аминогексанольная группа.

Табл.1. Количественные характеристики ингибирования теломеразы олигонуклеотидами.

олигонуклеотид\ название	IC ₅₀ ,нМ		
	RQ-ТРАП		ПТА
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	
c3N	не ингиб.	41.1±7.4	н.о.
c3M	100±20	5.2±0.9	н.о.
c3J	19±16	43±21	6.8±0,8
c3G	11.6±5.6	67±33	5.5±0,6
Mc3	75±57	175±137	77.4±10
Mc3N	35±18	2.2±0.8	118±20
MNc3	не ингиб.	18.4±5.6	н.о.
c3MN	не ингиб.	1.2±0.4	н.о.
M*c3N	15.7±8.2	0.51±0.11	72±8
Mc3N*	13.5±3.4	7±1	н.о.
c3Mc3N	184±58	0.7±0.5	н.о.
Nc3M	76±21	1.3±0.9	27±3
Nc3J	не ингиб.	1.5±0.7	н.о.
N*c3J	не ингиб.	1.3±0.6	н.о.
Jc3N	229±72	3.9±1.7	н.о.
Nmisc3J	не ингиб.	8.5±3.5	н.о.
Nc3Jmis	не ингиб.	11.2±0.8	н.о.
Nmisc3Jmis	не ингиб.	18.4±3.2	н.о.
compNc3J	не ингиб.	не ингиб.	н.о.
Mc3M	221±10	1.4±0.3	н.о.
M*c3M	11.9±0.3	0.3±0.1	19.3±2.5
MMc3	42±1	4.5±0.9	26.7±3
c3Mc3M	44±12	0.31±0.04	н.о.

не ингиб. - IC₅₀ больше, чем 500нМ.

При сравнении ингибирующей способности Mc3M и M*c3M видно усиление ингибирования в 10-20 раз при инверсии олигонуклеотида М. Этот эффект можно объяснить существованием преимущественной ориентацией для взаимодействия двух конъюгированных олигонуклеотидов М с димерной формой теломеразы (рис.6). В случае олигонуклеотида М расположение модификации с3 как на 5'- (с3M), так и на 3'-концах (Mc3) не влияет на ингибирование теломеразы (табл. 1), т.к. такая модификация возможно пространственно не мешает взаимодействию олигонуклеотида М и теломеразы (рис.6, рисунки возле с3M и Mc3). Дополнительным доказательством может служить разница в ингибировании Mc3M и с3M (или Mc3). Олигонуклеотиды с3M и Mc3 могут взаимодействовать по отдельности с двумя субъединицами димерной теломеразы, тогда как в олигонуклеотиде Mc3M 5'-конец Mc3 части пространственно будет мешать

связыванию 3'-конца сЗМ части с одной из субъединиц теломеразы. Из-за этого МсЗМ ингибирует теломеразу хуже ($IC_{50}=220нМ$), чем МсЗ в отдельности ($IC_{50}\sim 75нМ$), а М*сЗМ ингибирует лучше ($IC_{50}\sim 10нМ$) (рис. 6).

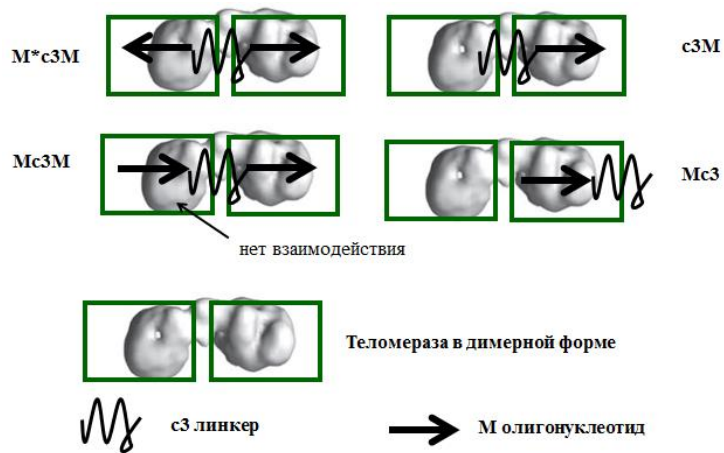


Рис. 6. Схематическое представление, показывающее разницу в ингибировании теломеразы олигонуклеотидами сЗМ, МсЗ, МсЗМ и М*сЗМ.

Олигонуклеотид N в системе *in vitro* не ингибирует теломеразу (табл. 2). Однако при конъюгировании его с M ингибирующая способность химерных олигонуклеотидов становится больше, чем олигонуклеотида M в отдельности. Например, химера МсЗN в два раза лучше ингибирует теломеразу, чем сЗМ, тогда как М*сЗN и МсЗN* ингибируют в 5 раз лучше. Такой эффект увеличения ингибирующей способности можно объяснить за счет внутримолекулярного взаимодействия. Известно, что внутримолекулярные взаимодействия сильнее чем межмолекулярные на несколько порядков. Олигонуклеотид N предназначен для взаимодействия с CR4/CR5 доменом hTR (рис.5A). В активном теломеразном комплексе этот домен связан с белком hTERT, и это взаимодействие возможно сильнее, чем взаимодействие CR4/CR5 домена с олигонуклеотидом N. В химере, объединяющей M и N, с теломеразой сначала взаимодействует олигонуклеотид M. В связи, с чем взаимодействие олигонуклеотида N с доменом CR4/CR5 hTR становится внутримолекулярным и может преодолеть взаимодействие hTERT белка с доменом CR4/CR5. По сравнению с химерой M и M, в химере M с N нет корреляции положения и ориентации олигонуклеотида N с ингибирующей способностью теломеразы. Возможные причины – это умение взаимодействовать олигонуклеотида N с обоими доменами CR4/CR5 hTR в димерной форме теломеразы и/или высокая конформационная подвижность домена CR4/CR5 hTR в активном теломеразном комплексе.

Были синтезированы химерные олигонуклеотиды, состоящие из олигонуклеотидов J и N. Такие химерные олигонуклеотиды интересны тем, что не содержат частей, комплементарных к матричной части hTR, и не имеют теломерной последовательности. Олигонуклеотид J в отдельности сильно ингибирует теломеразу, почти на уровне олигонуклеотида G. Однако при конъюгировании с N ингибирующая способность сильно уменьшается или полностью теряется (табл. 1). Единственным объяснением может быть

Олигонуклеотид N в системе *in vitro* не ингибирует теломеразу (табл. 2). Однако при конъюгировании его с M ингибирующая способность химерных олигонуклеотидов становится больше, чем олигонуклеотида M в отдельности. Например, химера МсЗN в два раза лучше ингибирует теломеразу, чем сЗМ, тогда как

пространственное затруднение взаимодействия олигонуклеотида J с теломеразным комплексом в J и N химерах. Для проверки правильности данных, полученных методом RQ-ТРАП, для некоторых олигонуклеотидов был дополнительно сделан анализ методом ПТА (табл.1). Полученные двумя разными методами данные согласуются друг с другом.

2.3. Ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами в клеточных линиях НЕК293

Мы изучили влияние олигонуклеотидов на теломеразную активность в клетках клеточной линии НЕК293. Для этого клетки были трансфицированы этими олигонуклеотидами и культивированы в течение двух дней. Из клеток выделили клеточный экстракт. Затем теломеразная активность полученных клеточных экстрактов была измерена методом RQ-ТРАП. Полученные данные приведены в табл. 1 (столбец *in vivo*).

В условиях *in vivo* получены отличные от *in vitro* данные ингибирования теломеразы

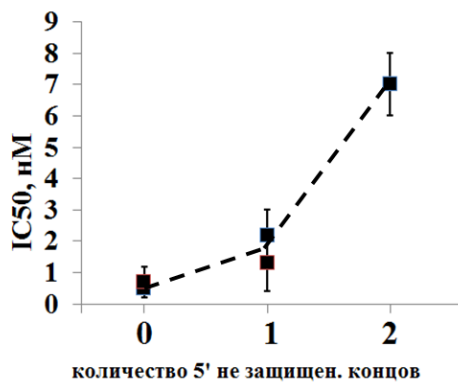


Рис. 7. Корреляция числа незащищенных 5'-концов и ингибирования теломеразы. Для представления были использованы химерные олигонуклеотиды, составленные из М и N частей: Mc3N* (количество 5'-незащищенных концов – 2), Mc3N и Nc3M (количество 5'-незащищенных концов – 1), M*c3N и c3Mc3N (количество 5'-незащищенных концов – 0).

выбранными олигонуклеотидами. Эффективность химерных олигонуклеотидов как ингибиторов теломеразы выше по сравнению с данными, полученными *in vitro*. Причиной является влияние ингибиторов на биогенез теломеразы в условиях *in vivo*. В системе *in vivo* ингибирование теломеразы зависит от стабильности олигонуклеотидов и ингибирования биогенеза, которые рассмотрены далее.

На данный момент не существует корректных универсальных методов определения стабильности олигонуклеотидов в клетке. В основном о стабильности олигонуклеотидов судят по функциональному анализу. Известно, что олигонуклеотиды могут деградировать как внутри, так и с 3'- и 5'-конца.

С 3'-конца мы защитили олигонуклеотиды аминоклином и исследовали стабильность, связанную с 5'-концом. Олигонуклеотиды Mc3N* и M*c3N ингибируют теломеразу одинаково в условиях *in vitro*. В первом олигонуклеотиде оба 5'-конца не защищены, во втором защищены полностью. В условиях *in vivo* их ингибирующие активности различаются в 10 раз. Существует корреляция между защитой 5'-конца и ингибирующей

способностью в условиях *in vivo* (рис. 7). Тот же эффект проявляется для олигонуклеотида Mc3M (табл. 1).

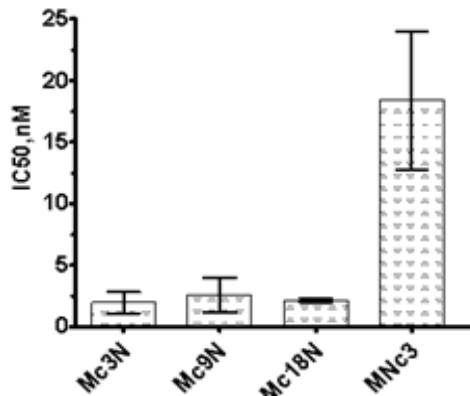


Рис.8. Влияние длины линкера и позиции в химерных олигонуклеотидах на ингибирование теломеразы *in vivo*.

Наиболее сильный эффект при защите 5'-конца проявляется для олигонуклеотида М. В условиях *in vitro* различия в ингибировании между с3М и Mc3 не было. Однако в условиях *in vivo* IC50 для 5'-защищенного с3М составляет 5,2 нМ, тогда как для 5'-незащищенного Mc3 – 175 нМ, что дает различие больше, чем в 30 раз. Для химерных олигонуклеотидов это отличие составляет всего 3-4 раза. Возможная причина заключается в том, что химерные олигонуклеотиды состоят из 2-х частей и 5'-защита во втором олигонуклеотиде сильно замедляет деградацию. Однако для

олигонуклеотидов Nc3J и N*c3J ингибирующие эффекты были одинаковы. Это может

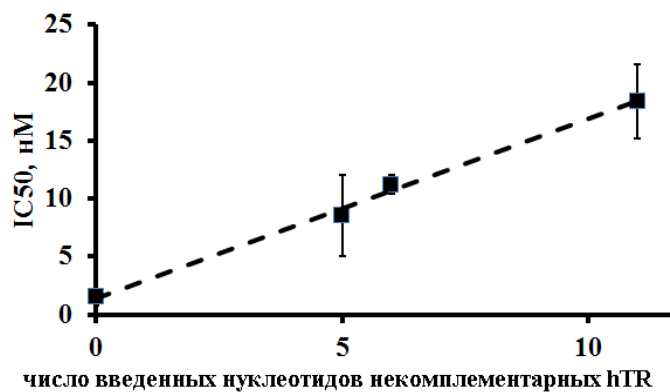


Рис.9. Корреляция зависимости ингибирующей способности химерных нуклеотидов в условиях *in vivo* от числа введенных замен нуклеотидов, некомплементарных hTR.

быть объяснено худшей ингибирующей способностью N*c3J по сравнению с Nc3J.

Для исследования влияния длины линкера на ингибирующую способность кроме химеры Mc3N, были синтезированы олигонуклеотиды, соединенные через триэтилен- и гексаэтиленгликоль. MNc3 был использован как контроль с нулевой длиной линкера.

Во всех олигонуклеотидах 5'-конец не защищен. Результаты представлены на рис. 8. Полученные данные показывают, что длина линкера между олигонуклеотидами не влияет на их ингибирующую способность.

Подозрение в специфичности вызвали химерные олигонуклеотиды, состоящие из N и J частей, так как в условиях *in vitro* эти олигонуклеотиды не ингибируют теломеразу, тогда как в системе *in vivo* сравнимы с остальными химерными олигонуклеотидами.

Для проверки специфичности ингибирования в условиях *in vivo* за счет комплементарности олигонуклеотида были введены нуклеотидные замены в каждую часть химеры Nc3J (Nmisc3J, Nc3Jmis, Nmisc3Jmis) (табл. 1), нарушающие такое

взаимодействие. Количество нуклеотидных замен составило 5-6 на каждую часть. Корреляция количества замен и ингибирующей способности оказалось линейной (рис.9). Замена N и J частей в Nc3J химере на комплементарные (compNc3compJ) (табл. 1) привела к полной потере ингибирующей способности в условиях *in vivo*. Это говорит о присутствии ингибирующего эффекта за счет комплементарных взаимодействий олигонуклеотидных частей химер и hTR.

Для подтверждения специфичности действия химерных олигонуклеотидов только на теломеразу была проверена токсичность наиболее активных химерных олигонуклеотидов на клетки НЕК293Е методом определения жизнеспособности клеток (МТТ) (рис. 10), так как ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами *in vivo* может быть обусловлено их цитотоксическим действием. Только в случае М*с3N и N*с3J (рис. 10, Д и Е) виден слабый спад выживаемости. Он начинается с концентрации 10 нМ и не доходит до 50%. Однако эти олигонуклеотиды снижают теломеразную активность наполовину при концентрации менее 1нМ.

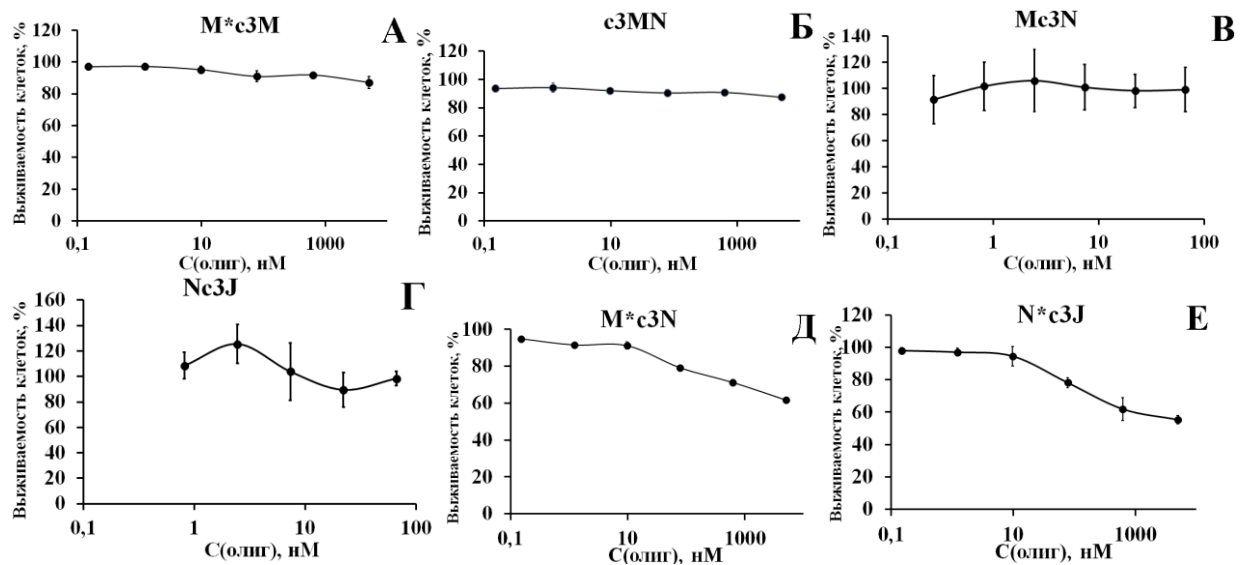


Рис. 10. МТТ анализ цитотоксичности химерных олигонуклеотидов при разной концентрации на клетках НЕК293Е. А - М*с3М, Б – с3MN, В- Mc3N, Г – Nc3J, Д – М*с3N, Е – N*с3J.

Из полученных данных следует, что влиянием токсичности олигонуклеотидов при оценке ингибирования теломеразы *in vivo* можно пренебречь.

Один из возможных путей, приводящих к снижению теломеразной активности это – деградация hTR. В связи с этим мы решили проверить стабильность hTR в клетках в присутствии химерных олигонуклеотидов.

Количество hTR в клетках НЕК293Е, культивируемых в присутствии различных концентраций химерных олигонуклеотидов, было измерено методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (RQ-ПЦР) с использованием мРНК фермента

глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) как внутреннего контроля, так как уровень мРНК этого фермента постоянен в клетке. Относительное количество полученной hTR нормировалось на количество GAPDH.

Для олигонуклеотидов Nc3J, Nmisc3Jmis, Nc3Jmis, c3MN, Mc3N и M*c3M при увеличении их концентрации при трансфекции уровень hTR в клетке значимо не менялся (рис. 11) и не коррелировал с изменением теломеразной активности. Следовательно, химерные олигонуклеотиды не влияют на стабильность hTR.

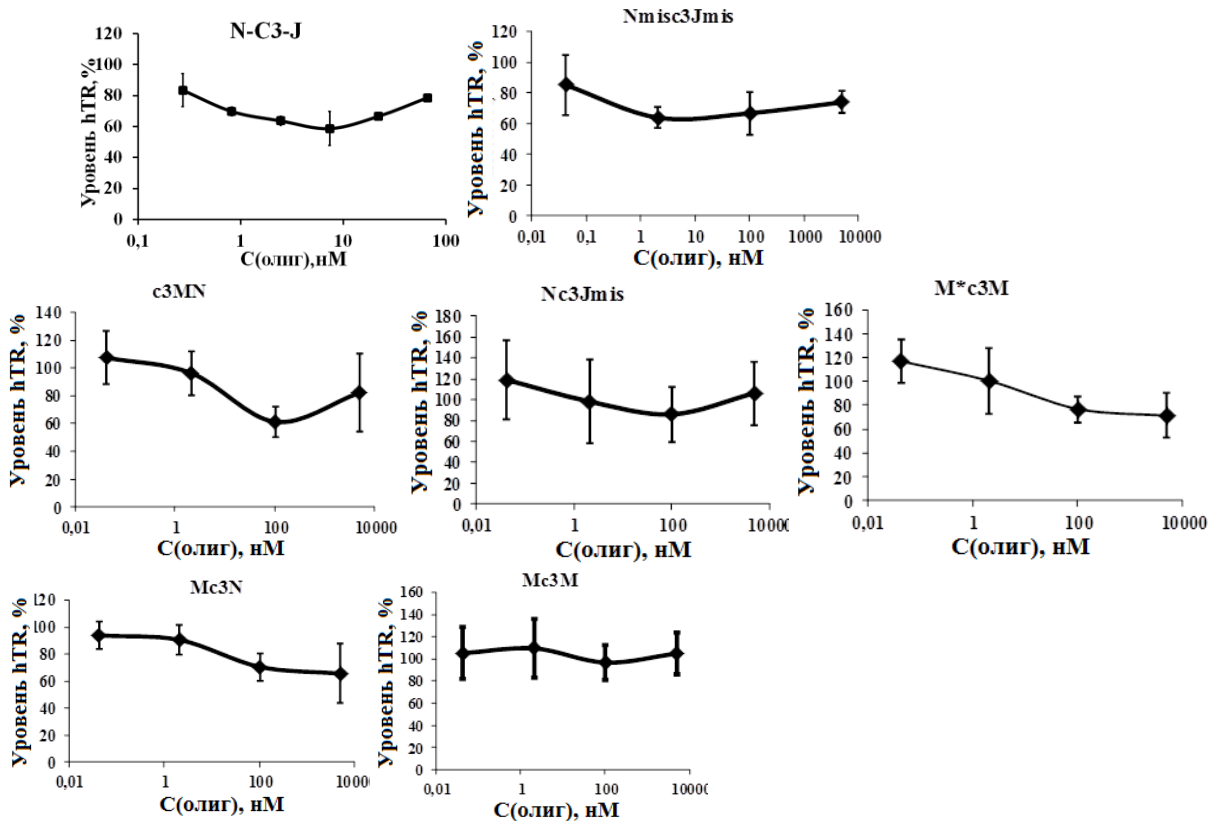


Рис. 11. Стабильность теломеразной РНК в условиях «*in vivo*» в присутствии разной концентрации химерных олигонуклеотидов. Представлены зависимости уровня hTR в % от концентрации используемых олигонуклеотидов в культуральной среде. За 100% принят уровень hTR в клетках, не обработанных олигонуклеотидами.

Из предыдущих данных видно, что химерные олигонуклеотиды не ингибируют теломеразу за счет деградации hTR и не имеют цитотоксического действия на клетки. Если эти олигонуклеотиды запускают какие-то сигнальные пути, то могут ингибировать теломеразу за счет подавления экспрессии или пост-трансляционной модификации hTERT. Однако наиболее вероятный и простой механизм ингибирования теломеразы в клетке — возможное нарушение сборки теломеразного комплекса за счет блокирования взаимодействия hTERT и hTR.

Для проверки возможного влияния химер на сборку теломеразы было проведено центрифугирование в сахарозном градиенте клеточных экстрактов, полученных после трансфекций клеток олигонуклеотидами, концентрация которых была больше, чем IC_{50} . Фракции после разделения были собраны, начиная с более тяжелых. В каждой фракции было измерено количество hTR и теломеразная активность. Данные показаны на рис.12.

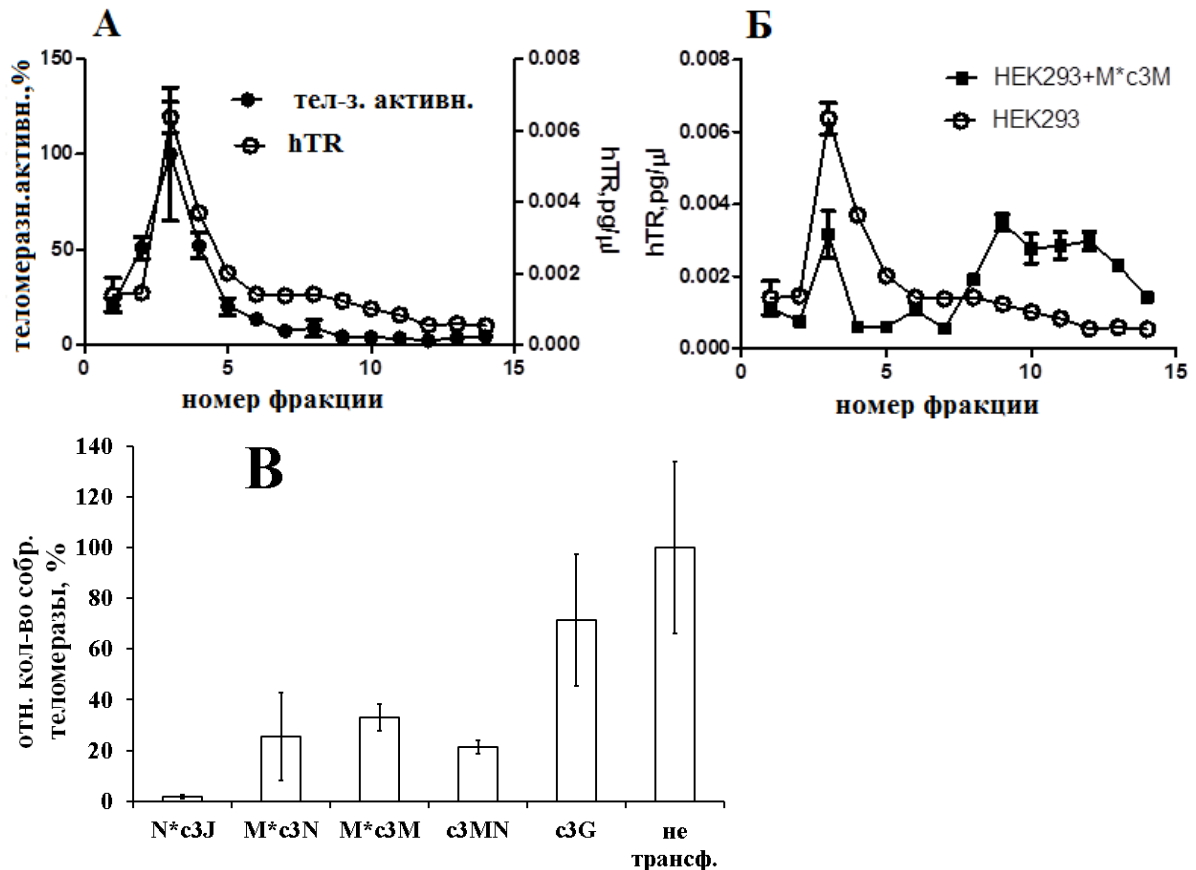


Рис.12. Оценка сборки теломеразы. А. Распределение hTR и теломеразной активности по фракциям градиента, полученного после центрифугирования клеточного экстракта HEK293 в градиенте сахарозы. Б. Распределение hTR после градиентного центрифугирования экстрактов полученных из клеток HEK293 и HEK293, трансфицированных M*c3M химерным олигонуклеотидом. В. Количество собранной теломеразы, оставшейся после трансфекции химерными олигонуклеотидами *in vivo*.

Для клеток HEK293 пик количества hTR совпадает с пиком теломеразной активности (рис.12А). Это означает, что этот пик принадлежит собранной теломеразе. Для сравнения, распределение hTR для клеток HEK293 клеток, инкубированных в присутствии M*c3M химеры (наиболее сильный теломеразный ингибитор в системе *in vivo*), показано на рис. 12Б.

Видно, что количество hTR сильно уменьшается (до 22%) в пике с собранной теломеразой. Данные для c3J и других эффективных химер Nc3J, M*c3N, c3MN

суммированы на рис.12В. Все наиболее активные химеры ощутимо влияют на сборку теломеразы. Самый сильный эффект показала химера Nc3J, для которой почти не детектировался собранный теломеразный комплекс. Необходимо отметить, что c3G почти не влиял на сборку теломеразы (рис.12В).

В ходе разработки новых подходов ингибирования теломеразы были созданы химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух модифицированных олигонуклеотидов, соединенных нуклеотидным линкером и комплементарных к разным участкам hTR. Было показано, что эти олигонуклеотиды не цитотоксичны и не вызывают деградацию мишени hTR в клетке. Был определен механизм действия таких химер, заключающийся в ингибировании сборки теломеразы. Также было показано, что усиление ингибирования теломеразы в клетке химерными олигонуклеотидами обеспечивается увеличением их стабильности за счет защиты на 5'-конце.

При анализе ингибирующих способностей химер *in vitro* оказалось, что химеры, состоящие только из разнонаправленных частей М, ингибируют теломеразу в 7 раз лучше, чем индивидуальный М. Это дополнительно подтверждает, что в условиях *in vitro* теломераза является димером. Разница для таких химер и отдельного М при анализе *in vivo* составила несколько порядков, что свидетельствует в пользу утверждения о димеризации hTR в процессе сборки теломеразного комплекса.

В условиях *in vitro* химерные олигонуклеотиды, состоящие из М и N частей, ингибировали теломеразу, тогда как слитый MN не ингибировал. Отсюда следует, что разработанные химерные олигонуклеотиды, состоящие из М и N, М и М частей, уменьшают активность теломеразы в клетке за счет ее прямого ингибирования и за счет блокирования сборки теломеразы одновременно. В ходе работы также была проверена специфичность действия химерных олигонуклеотидов в клетке. Эффективность химер JN при тестировании ингибирования теломеразной активности в клетке выше, чем у олигонуклеотида с последовательностью Иметелстата, почти в 30 раз. Доказанный механизм действия химер, а именно, блокирование сборки теломеразы, является несомненным плюсом для последующей разработки препаратов на их основе.

ВЫВОДЫ

1. Новая система экспрессии основных компонентов теломеразного комплекса человека позволяет повысить уровень теломеразы в клетках HEK293E по сравнению с описанными ранее.
2. Разработанный метод количественного определения теломеразной активности позволяет измерять ингибирование теломеразы веществами, влияющими на ПЦР и стабилизирующими G-квадруплексы.
3. Производные антра[2,3-b]тиофен-5,10-дион, 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4-он и его медь содержащий комплекс являются ингибиторами теломеразы.
4. Химерные олигонуклеотиды, состоящие из двух частей, комплементарных разным районам hTR и соединенных ненуклеотидным линкером, ингибируют сборку теломеразы.
5. Димеризация теломеразы человека подтверждена с помощью серии химерных олигонуклеотидов, ингибирующих активность теломеразы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vasilkova D.V., Azhibek D.M., Zatsepin T.S., Naraikina Y.V., Prassolov V.S., Proko M.M., Zvereva M.M., Rubtsova M.P. Dynamics of human telomerase RNA structure revealed by antisense oligonucleotide technique. // *Biochimie*. -2013.- V. 95.- P. 2423-2428.
2. Majouga A.G., Zvereva M.I., Rubtsova M.P., Skvortsov D.A., Mironov A.V., Azhibek D.M., etc. Mixed Valence Copper(I,II) Binuclear Complexes with Unexpected Structure: Synthesis, Biological Properties and Anticancer Activity. // *J Med Chem*.- 2014.- V. 57.- P. 6252-6258.
3. Azhibek D., Zvereva M., Zatsepin T., Rubtsova M., Dontsova O. Chimeric bifunctional oligonucleotides as a novel tool to invade telomerase assembly. // *Nucleic Acids Res*.- 2014.- V. 42. -P. 9531-9542.
4. Ilyinsky N.S., Shchyolkina A.K., Borisova O.F., Mamaeva O.K., Zvereva M.I., Azhibek D.M., etc. Novel multi-targeting anthra[2,3-b]thiophene-5,10-diones with guanidine-containing side chains: Interaction with telomeric G-quadruplex, inhibition of telomerase and topoisomerase I and cytotoxic properties. // *Eur J Med Chem*. -2014.- V. 85. -P. 605-614.
5. D. Azhibek, T. Zatsepin, M. Zvereva and O. Dontsova. Determination of kinetic parameters of telomerase inhibition by telomerase RNA template antagonist. // *FEBS Journal*.- 2013.- Issue Supplement s1. -V. 280. -P. 303.
6. M. Rubtsova, D. Vasilkova, A. Malyavko, D. Skvortsov, D.Azhibek and O. Dontsova. Endonuclease cleavage is the first event of human telomerase RNA 3'-end processing. // *FEBS Journal*.- 2013.- Issue Supplement s1. -V. 280. -P. 47.