



УДК 577.113.4

НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ ФОТОБЛОКИРОВАННЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ДЛЯ АКТИВИРУЕМОЙ СВЕТОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

© 2022 г. Е. А. Ахметова*, Д. В. Ким*, А. С. Доме*,
М. И. Мещанинова*, Д. С. Новопашина*. **, #

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

**Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 09.12.2021 г.

После доработки 20.12.2021 г.

Принята к публикации 28.12.2021 г.

Фоторегулируемые системы – интересный и перспективный инструмент воздействия на экспрессию генов. В данной работе предложен подход к синтезу фоторегулируемых малых интерферирующих РНК (siРНК) для активируемой светом РНК-интерференции. siРНК временно блокируют путем введения на 5'-концы цепей siРНК объемных лигандов через фоторасщепляемый линкер. Введение осуществляют путем активации концевой гидроксильной группы дисукцинимидилкарбонатом с последующим взаимодействием с аминоксодержащим лигандом. В качестве функциональных лигандов использованы аминоксодержащие производные холестерина и трилейцин. Продемонстрировано эффективное отщепление группировки, введенной через фоторасщепляемый линкер, путем облучения УФ-светом. С использованием предложенного подхода получены siРНК, содержащие остатки холестерина на 5'-конце антисенс- и/или сенс-цепи и направленные на мРНК EGFP (усиленного зеленого флуоресцентного белка). Продемонстрирована возможность фотоактивируемого ингибирования экспрессии гена *EGFP* в клетках НЕК293FT, стабильно экспрессирующих этот белок.

Ключевые слова: фоторасщепляемый линкер, фотоактивируемые siРНК, холестеринные конъюгаты, зеленый флуоресцентный белок

DOI: 10.31857/S0132342322050037

ВВЕДЕНИЕ

Неинвазивная регуляция путем облучения светом определенной длины волны позволяет эффективно управлять активностью различных молекулярно-биологических систем *in vitro* и *in vivo*. Введение светочувствительных молекул в состав олигонуклеотидов или белков позволяет изменять их активность в клетках с высоким пространственно-временным разрешением.

Для временного блокирования функций олигонуклеотидов, в том числе малых интерферирующих РНК (siРНК), используют функциональные группировки, введенные посредством фоторасщепляемого линкера в состав олигонуклеотида. Для

синтеза таких конструкций чаще всего используют твердофазный фосфитамидный метод с последовательным присоединением фосфитамида фоторасщепляемого линкера и фосфитамида функциональной группировки на 5'-конец. Такие конъюгаты могут выступать в качестве фотоблокированных олигонуклеотидных конструкций, которые могут быть активированы в определенный момент времени. siРНК, содержащие лиганды, введенные посредством фоторасщепляемого линкера, широко применяются в фотоконтролируемой РНК-интерференции [1–4].

Цель данного исследования – разработка нового подхода к синтезу фоторегулируемых siРНК, содержащих введенные через фоторасщепляемый линкер функциональные группировки, для активируемой светом РНК-интерференции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе предложен новый подход к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов, заключа-

Сокращения: NMP – *N*-метилпирролидинон; ДСК – *N,N*-дисукцинимидилкарбонат; DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин; ESI – ионизация распылением в электрическом поле; EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок (enhanced green fluorescent protein); siРНК – малые интерферирующие РНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (343) 363-51-29; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

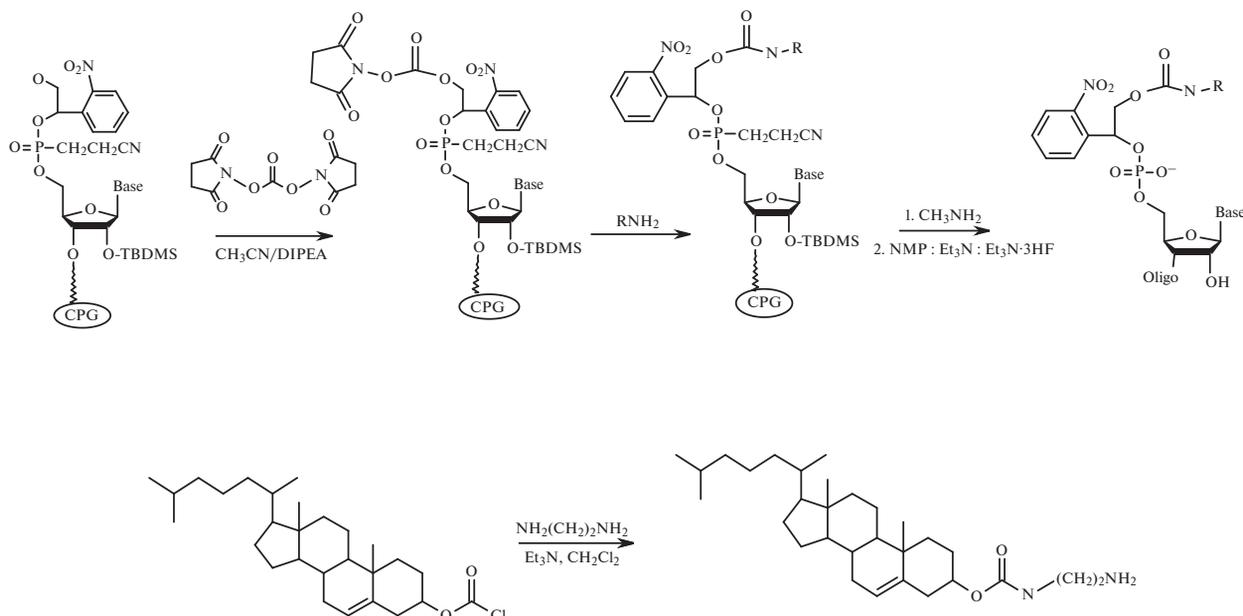


Рис. 1. Схема синтеза конъюгатов олигорибонуклеотидов с холестерином и трилейцином. Base – азотистое основание, Oligo – олигонуклеотид.

ющийся во введении через фоторасщепляемый линкер функциональных группировок на 5'-конец полимерсвязанного олигорибонуклеотида путем активации концевой гидроксильной группы *N,N*-дисукцинимидилкарбонатом с последующим взаимодействием с аминопроводным. В качестве функциональных лигандов использовали холестерин и трилейцин. Проверку работоспособности метода проводили на антисенс-цепи siРНК к мРНК гена *MDR1*, последовательность которой была взята из работы Кругловой с соавт. [5]. Данная РНК содержала несколько замен пиримидиновых рибонуклеотидов на 2'-*O*-метилрибонуклеотиды для повышения стабильности siРНК к нуклеазам. На первом этапе твердофазным амидофосфитным методом получали полимерсвязанный олигорибонуклеотид RNA1 с использованием на последней стадии специально полученного фотолabile синтона на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола [6]. Затем на

твердой фазе присоединяли остатки холестерина или трилейцина. Для этого использовали недавно разработанный нами метод активации свободной гидроксильной группы олигонуклеотида *N,N'*-дисукцинимидилкарбонатом с последующей реакцией с аминопроводными [7] (рис. 1).

Аминопроводное холестерина получали взаимодействием холестерилхлорформата с гексаметилендиамином в хлористом метиле в присутствии триэтиламина [7]. Структуры полученных конъюгатов олигорибонуклеотида RNA1 представлены в табл. 1.

Полученные конъюгаты деблокировали в стандартных условиях. По данным аналитического гель-электрофореза в денатурирующем 15%-ном ПААГ, степень превращения олигонуклеотида в конъюгаты можно оценить как 50–60%, подвижность конъюгатов в геле была значительно ниже, чем подвижность контрольных немодифицированных олигорибонуклеотидов, а также

Таблица 1. Фотолabile конъюгаты олигорибонуклеотидов

Шифр	Структура олигорибонуклеотида
RNA	5'-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'
RNA1	5'-PL-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'
RNA1-Chol	5'-Chol-PL-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'
RNA1-Leu ₃	5'-(Leu) ₃ -PL-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG-3'

Примечание: N – рибонуклеотид, N^m – 2'-*O*-метилрибонуклеотид, PL – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола, Chol – аминопроводное холестерина, (Leu)₃ – трилейцин.

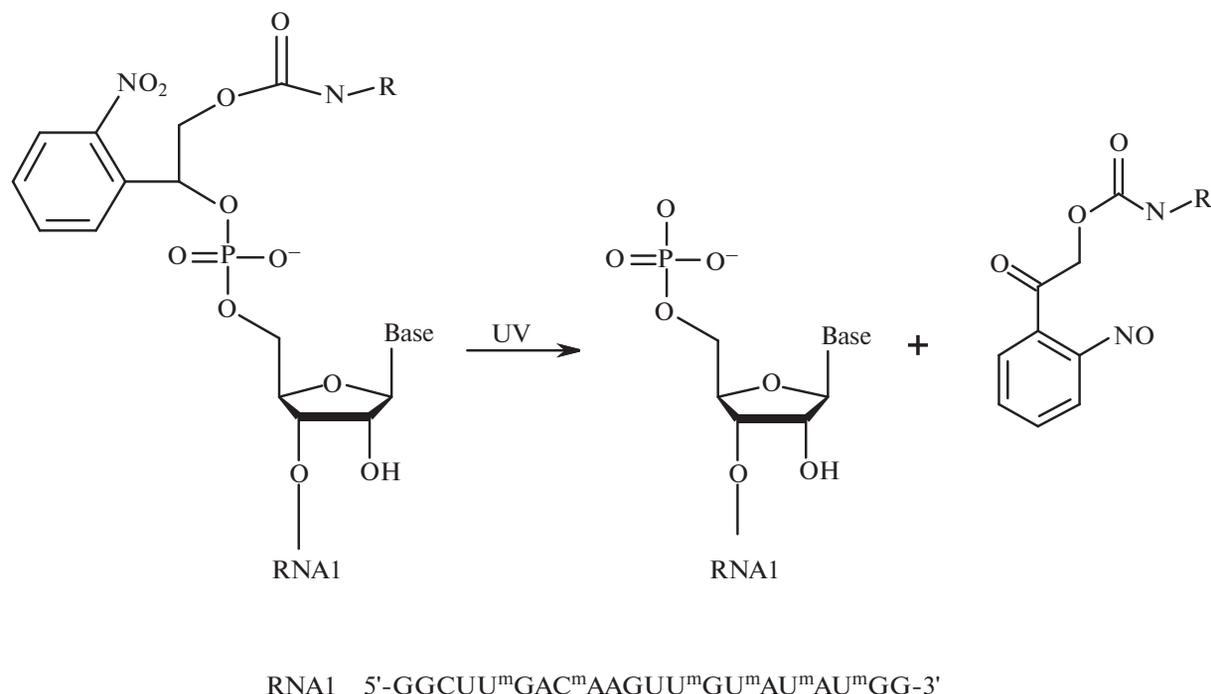


Рис. 2. Отщепление функциональной группы от олигорибонуклеотида под действием УФ-света. R – аминопроизводное холестерина или трилейцин, Base – азотистое основание.

5'-модифицированных олигонуклеотидов, содержащих фотоактивируемую группу.

Конъюгаты выделяли методом гель-электрофореза в 12%-ном ПААГ. Были получены конъюгаты олигорибонуклеотида RNA1 с холестерином и трилейцином, введенными с использованием фоторасщепляемого линкера, а также контрольный немодифицированный олигорибонуклеотид и его аналог, несущий на 5'-конце фототщепляемую группу.

Для исследования способности расщепляться под воздействием ультрафиолетового излучения растворы олигорибонуклеотидов облучали в течение 30 мин ($\lambda = 365$ нм), полученные реакционные смеси анализировали методами офВЭЖХ и гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ.

Результаты исследования кинетики расщепления конъюгатов олигорибонуклеотида RNA1 (RNA1-Chol и RNA1-Leu₃) получали путем анализа аликвот раствора олигонуклеотида, облученных определенное время, в 15%-ном ПААГ с окрашиванием геля после электрофореза бромистым этидием (рис. 2).

Реакция проходит по описанному ранее [8] механизму с высвобождением немодифицированного олигорибонуклеотида. При отщеплении функциональной липофильной группы, холестерина или трилейцина, подвижность продукта в геле увеличивается и соответствует контрольному

олигорибонуклеотиду RNA1. При исследовании кинетики отщепления функциональных группировок от олигорибонуклеотида (рис. 3) была выявлена более высокая эффективность отщепления трилейцина по сравнению с холестерином. Времена полуреакции для конъюгата с трилейцином и конъюгата с холестерином составили 0.8 и 1.5 мин соответственно.

Таким образом, нами была продемонстрирована возможность отщепления функциональных

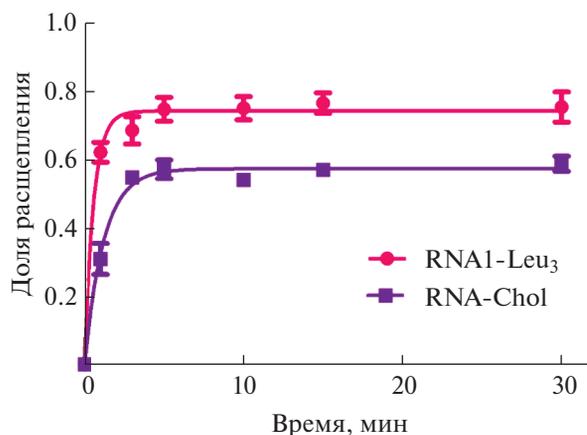


Рис. 3. Кинетические кривые отщепления холестерина и трилейцина при облучении конъюгатов RNA1-Leu₃ и RNA1-Chol.

Таблица 2. Последовательности siРНК и их конъюгатов с холестерином для подавления экспрессии гена *EGFP* в клетках линии НЕК293FT

Шифр	Тип цепей	Последовательности siРНК
siRNA1	AS/S	5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-5'
siRNA2	AS-Chol/S-Chol	5'-Chol-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-Chol-5'
siRNA3	AS-PL-Chol/S-PL-Chol	5'-Chol-PL-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-PL-Chol-5'
siRNA4	AS/S-Chol	5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-Chol-5'
siRNA5	AS-Chol/S	5'-Chol-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-5'
siRNA6	AS/S-PL-Chol	5'-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-PL-Chol-5'
siRNA7	AS-PL-Chol/S	5'-Chol-PL-GGCAAGCUGACCCUGAAGUdTdT-3' 3'-dTdTCCGUUCGACUGGGACUUCA-5'

Примечание: *PL* – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола; Chol – остаток холестерина, введенный через диаминогексановый линкер.

групп, присоединенных через фоточувствительный линкер, что подтверждает перспективность использования выбранного нами 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиольного линкера для создания фоточувствительных siРНК.

На следующем этапе работы нами были синтезированы siРНК, подавляющие экспрессию гена *EGFP* (enhanced green fluorescent protein). Последовательность siРНК была выбрана на основании результатов публикации Zhang et al. [9].

Для клеточных экспериментов нами была получена линия клеток НЕК293FT, стабильно экспрессирующая белок EGFP. Предварительно мы показали, что синтезированная контрольная немодифицированная siРНК способна подавлять экспрессию гена *EGFP* в созданной линии клеток НЕК293FT на 65% (данные не приведены).

Затем нами были получены антисенс- и сенс-цепи siРНК, содержащие остатки холестерина на 5'-конце, введенные напрямую или через фоторасщепляемый линкер (табл. 2). Введение остатков холестерина напрямую не позволяет удалить остаток холестерина путем УФ-облучения, в отличие от конъюгатов, в которых холестерин введен через фоторасщепляемый линкер. Собраны дуплексы siРНК, содержащие различные сочетания 5'-модифицированных цепей.

Проведено исследование подавления экспрессии гена *EGFP* созданными siРНК в клетках НЕК293FT, стабильно экспрессирующих этот репортерный белок. После трансфекции siРНК в клетки липофектамином 3000 регистрировали экспрессию гена *EGFP* по флуоресценции белка

по отношению к флуоресценции белка в необработанных клетках (рис. 4а).

Во всех случаях, когда в составе конструкции холестерин был присоединен к 5'-концу антисенс-цепи как напрямую, так и через фоторасщепляемый линкер, не регистрировали уменьшения флуоресценции EGFP в клетках, что согласуется с литературными данными об ингибировании процесса интерференции при введении группировок в это положение siРНК [10, 11]. Максимальную эффективность подавления экспрессии продемонстрировали немодифицированная контрольная siRNA1, siRNA4 (AS/S-Chol), содержащая холестерин на 5'-конце сенс-цепи, и siRNA6 (AS/S-PL-Chol), содержащая холестерин, введенный на 5'-конец сенс-цепи через фоторасщепляемый линкер. Значительно меньшую интерферирующую активность проявили siРНК, содержащие модифицированную холестерином антисенс-цепь, а именно siRNA2 и siRNA3, содержащие два остатка холестерина, введенные напрямую или через фоторасщепляемый линкер по 5'-концам цепей РНК (AS-Chol/S-Chol и AS-PL-Chol/S-PL-Chol соответственно), а также siRNA5 и siRNA7, содержащие один остаток холестерина, введенный напрямую или через фоторасщепляемый линкер на 5'-конец антисенс-цепи (AS-Chol/S и AS-PL-Chol/S соответственно).

Затем провели аналогичный эксперимент, но с дополнительным УФ-облучением клеток после трансфекции в течение 5 мин. Результаты исследования ингибирования экспрессии гена *EGFP* холестериновыми конъюгатами siРНК в клетках с облучением и без него приведены на рис. 4б.

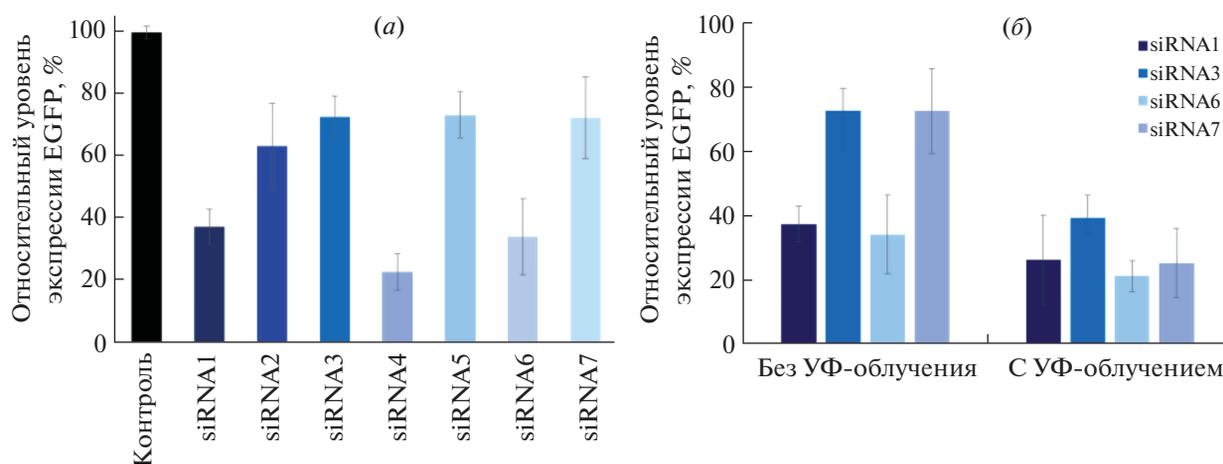


Рис. 4. Относительные уровни экспрессии гена *EGFP* в клетках линии HEK293FT после трансфекции 7.5 пмоль siРНК в течение 24 ч с использованием липофектамина 3000 и последующей инкубации в течение 48 ч. За 100% принята флуоресценция необработанных клеток. (а) – Сравнительное исследование уровня экспрессии гена *EGFP* для всех полученных в работе siРНК. Контроль – клетки, не трансфицированные siРНК; (б) – сравнительное исследование относительных уровней экспрессии гена *EGFP* с УФ-облучением в течение 5 мин и без него. Все эксперименты выполнены в трех повторах.

В этом эксперименте показано, что УФ-облучение вызывает увеличение степени ингибирования экспрессии гена *EGFP* в клетках при использовании siРНК с остатками холестерина (siRNA3, siRNA6, siRNA7), введенными через фоторасщепляемый линкер. Наибольшую разницу в ингибировании экспрессии гена *EGFP* до и после облучения продемонстрировали siRNA3 и siRNA7, содержащие холестерин на 5'-конце антисенс-цепи.

Таким образом, продемонстрирована возможность использования созданных фотоактивируемых siРНК с остатками холестерина на 5'-конце антисенс-цепи, введенными через фоторасщепляемый линкер, для включения системы РНК-интерференции путем облучения УФ-светом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и оборудование. В работе использовали следующие реактивы: перхлорат натрия, дисукцинимидилкарбонат, холестерилхлорформат, *N*-метилимидазол (Acros Organics, США); 5-этилтио-1*H*-тетразол (Biosset, Россия); полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном: 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)тимидин-CPG, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсил-*N*2-ацетилгуанозин-CPG, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсил-уридин-CPG; 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-*N*-ацетилзащищенные 2'-*O*-метилрибо-, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил), 2'-*O*-третбутилдиметилсил-*N*-ацетилзащищенные, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил), 2'-*O*-триизопропилсил-оксиметил-*N*-ацетилзащищенные рибонуклеозид-

3'-фосфитамиды (ChemGenes, США); краситель Stains-all, персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид, 2,6-лутидин, бромистый этидий (Fluka, Швейцария); мочевины, 40%-ный водный раствор метил-амин (Merck, Германия); молекулярные сита Trap-Pac™ Molecular Sieve Bag 3 Å (Millipore, США); ксиленианол FF, бромфеноловый синий, *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусная кислота (Serva, Германия); трилейцин, триэтиламин, *N*-метилпирролидон, триэтиламинтригидрофторид, гексаметилендиамин, этокситриметилсилан, *N,N*-диизопропилэтиламин (DIPEA) (Sigma-Aldrich, США); *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (ДСК) (Acros Organics, США); хлористый метилен, формамид (Реахим, Россия); ацетонитрил (Криохром, Россия); другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства.

Синтез 1-(2-циано-*N,N*-диизопропилфосфитамид)-2'-*O*-4,4'-диметокситритил-1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола проведен по методике Ахметовой с соавт. [6]. Холестерил-6-аминогексилкарбамаат получали, как описано в работе Meschaninova et al. [7].

Все водные растворы, используемые в работе, были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США). Концентрирование растворов олигонуклеотидов производили на вакуумном концентраторе Speed-Vac Concentrator SCV 100 H (Savant, США).

Осаждение олигонуклеотидов из растворов проводили центрифугированием на центрифугах

MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия). Перемешивание растворов осуществляли с помощью Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия). Оптическую плотность растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (ThermoScientific, США).

Фосфитамидный синтез олигонуклеотидов.

Олигорибонуклеотиды и смешанные олиго(рибо-/2'-*O*-метилрибо)нуклеотиды были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) в масштабе 0.4 мкмоль с использованием протоколов, оптимизированных для данного прибора. Синтез проводили в реакторах на 50 мкл согласно разработанному протоколу операций. Использовали полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном на полимерном носителе SPG.

Деблокирование и отделение олигорибонуклеотидов от полимерного носителя. Деблокировали и отделяли от полимерного носителя полученные олигорибонуклеотиды 40%-ным раствором метиламина в течение 15 мин при 65°C и постоянном перемешивании. Охлаждали в течение 10 мин при -20°C. Промывали раствором ацетонитрил-этанол-вода (1 : 1 : 1). Растворы объединяли и упаривали досуха.

Для удаления защитных групп 2'-OTBDMS к сухому остатку сразу после упаривания добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора NMP : Et₃N : Et₃N · 3HF (1.5 : 0.75 : 1, v/v/v) и выдерживали при 65°C и перемешивании в течение 1.5 ч. Добавляли 300 мкл этоксисетриметилсилана и перемешивали на термомиксере в течение 10 мин при 25°C. К полученной смеси добавляли 1 мл серного эфира, перемешивали, центрифугировали, раствор отбирали, осадок промывали серным эфиром, после чего высушивали на воздухе.

Осаждение олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды осаждали из водных растворов в виде натриевых солей десятикратным объемом 2%-ного раствора перхлората натрия в ацетоне. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали ацетоном и высушивали досуха на воздухе.

Аналитический гель-электрофорез в ПААГ. Анализ реакционных смесей, а также выделенных олигонуклеотидов и их конъюгатов проводили методом гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ (акриламид : *N,N'*-метиленабисакриламид, 29 : 1) в денатурирующих условиях (8 М мочевины, 50 мМ Tris-H₃BO₃, pH 8.3, 0.1 М Na₂ЭДТА). Для нанесения на гель использовали 5 мкл раствора 8 М мочевины с содержанием 0.025% ксиленианолового FF. Для визуализации олигонуклеотидов и их конъюгатов использовали раствор красителя Stains-all, приготовленный из 50 мг красителя

Stains-all и 100 мл смеси вода-формамид (1 : 1). После окрашивания гели сушили на приборе Gel Dryer 583 (Bio-Rad, США). При необходимости количественной оценки использовали окрашивание геля бромистым этидием с последующей визуализацией на приборе Quantum Vilber Lourmat (Vilber Lourmat, Франция) ($\lambda = 312$ нм).

Препаративный гель-электрофорез. Деблокированные олигонуклеотиды и их конъюгаты выделяли с помощью препаративного гель-электрофореза в денатурирующем 15%- или 12%-ном ПААГ в вышеуказанных условиях. Олигорибонуклеотиды визуализировали в геле при наложении геля на пластину DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в свете УФ-лампы ($\lambda = 254$ нм), при этом для предотвращения активации реакции фоторасщепления под воздействием УФ-излучения закрывали стеклом основную часть геля, содержащую продукт, оставляя доступной для УФ-облучения только небольшую его часть, достаточную для визуализации.

Элюция олигонуклеотидов из геля. Измельченный гель помещали в пробирку типа Eppendorf на 1.5 мл с 1 мл 0.3 М раствора перхлората натрия или в пробирку на 15 мл с 6–7 мл того же раствора. Выдерживали 16 ч при перемешивании на термомиксере Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия) при 25°C.

Супернатант отбирали и проводили обессоливание на картридже Tet-Pak C18 (Millipore, США), промывая 0.3 М NaClO₄, затем 50%-ным водным раствором ацетонитрила. Фракции, содержащие продукт, упаривали до 100–150 мкл и осаждали олигонуклеотиды в виде натриевых солей, как описано выше.

Синтез фоточувствительных и фотостабильных конъюгатов олигорибонуклеотидов с функциональными группами на 5'-конце (RNA1-Chol, RNA1-(Leu)₃, AS-Chol, S-Chol, AS-PL-Chol, S-PL-Chol). На автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) стандартным твердофазным методом синтеза получали 21-звенный полностью защищенный олигорибонуклеотид RNA1. Удаляли 5'-диметокситригильную защитную группу. Включение фоторасщепляемого линкера в цепь олигонуклеотида проводили с использованием 0.25 М раствора 1-(2-циано-*N,N*-диизопропилфосфитамида)-2-*O*-4,4'-диметокситригиль-1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. Время конденсации в присутствии этилтио-1*H*-тетразола составляло 30 мин.

Для получения конъюгатов на первом этапе проводили активацию свободной гидроксильной группы полимерсвязанного олигорибонуклеотида дисукцинимилкарбонатом (ДСК). Для этого раствор 10 мг ДСК в 270 мкл абсолютного ацето-

нитрила и 30 мкл DIPEA добавляли к полимерному носителю. Реакцию проводили в течение 1 ч при 37°C и перемешивании. Затем раствор над полимером отбирали и добавляли свежеприготовленный раствор 7 мг ДСК в 270 мкл абсолютного ацетонитрила и 30 мкл DIPEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при 37°C, раствор над полимером отбирали. Последнюю процедуру повторяли дважды.

Для присоединения холестерил-6-аминогексилкарбамата или трилейцина раствор 11 мг Chol-CO-NH-(CH₂)₆-NH₂ в 225 мкл абсолютного тетрагидрофурана и 25 мкл DIPEA или, соответственно, раствор 10 мг трилейцина в 225 мкл абсолютного ацетонитрила и 25 мкл DIPEA добавляли к полимеру с присоединенным олигорибонуклеотидом, несущим активированную ДСК гидроксильную группу. Реакцию проводили в течение 1 ч при 37°C и перемешивании. Затем в реакционную смесь добавляли еще одну порцию аминпроизводного (холестерина или трилейцина), а именно раствор 5 мг Chol-CO-NH-(CH₂)₆-NH₂ в 135 мкл абсолютного тетрагидрофурана и 15 мкл DIPEA, или, соответственно, раствор 5 мг трилейцина в 135 мкл абсолютного ацетонитрила и 15 мкл DIPEA. Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 16 ч при 37°C. По окончании реакции раствор над полимерным носителем отбирали, полимер промывали дважды по 150 мкл THF или 150 мкл AcN, затем дважды по 150 мкл ацетона и высушивали на воздухе. Полученные конъюгаты олигорибонуклеотидов деблокировали и выделяли препаративным гель-электрофорезом.

Исследование кинетики отщепления группировок, присоединенных к олигорибонуклеотидам через фотолabileный линкер, под воздействием УФ-облучения. Пробы, содержащие 0.1 о.е. конъюгата олигорибонуклеотида с фотолabileным линкером, облучали в течение определенного времени (1, 3, 5, 10, 15 и 30 мин) при длине волны 365 нм с использованием трансиллюминатора с УФ-лампой (Vilber Lourmat, США). После облучения пробы анализировали аналитическим гель-электрофорезом в 15%-ном денатурирующем ПААГ с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией с использованием системы гель-документации Quantum (Vilber Lourmat, Франция). Для получения количественных характеристик изображения переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

Расчет кинетических параметров расщепления фоточувствительных конъюгатов олигорибонуклеотидов. Данные, полученные по результатам расщепления конъюгатов олигорибонуклеотидов, обрабатывали в программе Microsoft Excel. Долю продукта реакции рассчитывали как отно-

шение интенсивности полосы, соответствующей продукту реакции, к суммарной интенсивности полос, соответствующих исходному конъюгату и продуктам реакции. Полученные данные описывали уравнением для реакции псевдопервого порядка в программном пакете GraphPad Prism 5.0.4.533 (GraphPad Software, США):

$$f_a = Pl(1 - e^{-k_{obs}t}),$$

где f_a – доля продукта реакции, Pl – доля продукта при переходе реакции в стационарную фазу (предельная степень расщепления), k_{obs} – константа реакции псевдопервого порядка, t – время реакции.

Трансфекция клеток-продуцентов лентивирусных частиц третьего поколения (НЕК293FT) кальций-фосфатным методом. За день до трансфекции 4×10^6 клеток линии НЕК293FT (Invitrogen, США) высевали на чашку Петри диаметром 10 см. В 1.5-мл пробирке типа Eppendorf смешивали 1 мл 0.25 мМ раствора CaCl₂, по 4 мкг упаковочных плазмид рLP1 (содержит кодирующие последовательности генов *gag* и *pol*), рLP2 (содержит последовательность, кодирующую белок Rev), рLP/VSVG (содержит последовательность, кодирующую гликопротеин G вируса везикулярного стоматита) и целевой плазмиды рLVX-CMV-Fluc-P2A-EGFP-PGK-Puro (содержит последовательность гена *EGFP*), инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Полученный раствор смешивали с 1 мл буфера HBS (280 мМ NaCl, 100 мМ HEPES, 1.5 мМ Na₂HPO₄; pH 7.12) и по каплям приливали к клеткам. Через 6–8 ч после трансфекции заменяли среду на свежую. Продукентов инкубировали в течение 48 ч. Затем собирали среду, содержащую вирусные частицы, пропуская через фильтр 0.45 мкм, разбивали весь объем на аликвоты по 1 мл, замораживали и хранили при –70°C.

Получение трансгенной линии НЕК293FT, стабильно экспрессирующей белок EGFP. Клетки НЕК293FT высевали в лунки 6-луночного планшета по 500 тыс. клеток на лунку. По достижении 70%-ной конфлюентности среду убирали, приливали по каплям по 2 мл среды, содержащей вирусные частицы. Через 48 ч после трансдукции производили отбор EGFP-положительной популяции клеток на приборе S3e Cell Sorter (Bio-Rad, США).

Исследование подавления экспрессии гена EGFP созданными siРНК в клетках НЕК293FT методом проточной цитофлуориметрии. Для трансфекции siРНК клетки, стабильно экспрессирующие EGFP, высевали в 48-луночный планшет в количестве 45 тыс. клеток на одну лунку. На следующий день готовили два раствора. Первый раствор содержал среду Opti-MEM (Invitrogen, США; 12.5 мкл) и siРНК (7.5 пмоль). Второй раствор

содержал среду Opti-MEM (12.5 мкл) и 0.75 мкл липофектамина 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Растворы смешивали в соотношении 1 : 1 для получения конечной смеси. Полученную смесь оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Перед проведением трансфекции у клеток, выросших в планшете, меняли старую среду для культивирования на Opti-MEM (175 мкл), после этого к клеткам добавляли конечную реакционную смесь, содержащую липофектамин 3000 и siРНК. Клетки оставляли на 24 ч в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия), затем производили замену культуральной среды на свежую полную среду DMEM (0.5 мл) и оставляли в CO₂-инкубаторе еще на 48 ч. По окончании периода инкубации клетки собирали с помощью трипсина и фиксировали в 1%-ном растворе формальдегида. Для исследования активации siРНК клетки через 24 ч после начала трансфекции облучали УФ-светом с длиной волны 365 нм в течение 5 мин. Эффективность ингибирования экспрессии гена *EGFP* определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора Novocyte (ACEA Biosciences, США).

Статистический анализ данных. Для получения статистически достоверных результатов эксперименты повторяли минимум трехкратно, результаты измерений представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании разработан новый подход к получению фотоактивируемых siРНК для фотоконтролируемой РНК-интерференции в эукариотических клетках. Созданные конъюгаты siРНК с холестерином, введенным через фоторасщепляемый линкер на 5'-конец обеих цепей или только в антисенс-цепи, способны активировать систему РНК-интерференции в этих клетках после облучения УФ-светом.

Разработанный подход может быть использован при создании других фотоактивируемых siРНК для контролируемой светом регуляции экспрессии различных генов в эукариотических клетках.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. А.Г. Веняминовой (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за ценные рекомендации при написании статьи.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00838) и базового бюджетного финансирования в рамках госзадания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (2021–2023 гг.) № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nguyen Q.N., Chavli R.V., Marques J.T., Conrad P.G., Wang D., He W., Belisle B.E., Zhang A., Pastor L.M., Witney F.R., Morris M., Heitz F., Divita G., Williams B.R.G., McMaster G.K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1758. P. 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.003>
2. *Yang J., Chen C., Tang X.* // *Bioconj. Chem.* 2018. V. 29. P. 1010–1015. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00080>
3. *Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., Tang X.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 128. P. 2192–2196. <https://doi.org/10.1002/anie.201510921>
4. *Ando H., Kobayashi M., Tsubokawa T., Uyemura K., Furuta T., Okamoto H.* // *Dev. Biol.* 2005. V. 287. P. 456–468. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.023>
5. *Круглова Н.С., Мещанинова М.И., Веняминова А.Г., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л.* // *Мол. биология.* 2010. Т. 44. С. 284–293. [*Kruglova N.S., Mещанинова M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlasov V.V., Chernolovskaya E.L.* // *Mol. Biol.* 2010. V. 44. P. 254–261.] <https://doi.org/10.1134/S002689331002010X>
6. *Ахметова Е.А., Гольшев В.М., Вохтанцев И.П., Веняминова А.Г., Новопашина Д.С.* // *Биоорг. химия.* 2021. Т. 47. С. 276–286. [*Akmetova E.A., Golyshv V.M., Vokhtantsev I.P., Venyaminova A.G., Novopashina D.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 496–504.] <https://doi.org/10.1134/S1068162021020023>
7. *Meschaninova M.I., Novopashina D.S., Semikolenova O.A., Silnikov V.N., Venyaminova A.G.* // *Molecules.* 2019. V. 24. P. 4266. <https://doi.org/10.3390/molecules24234266>
8. *Pelliccioli A.P., Wirz J.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002. V. 1. P. 441–458. <https://doi.org/10.1039/b200777k>
9. *Zhang M., Bai C.-X., Zhang X., Chen J., Mao L., Gao L.* // *RNA Biol.* 2004. V. 1. P. 74–77.
10. *Zhang J., Jing N., Fan X., Tang X.* // *Chemistry.* 2020. V. 26. P. 14002–14010. <https://doi.org/10.1002/chem.202003084>
11. *Wang Q., Fan X., Jing N., Zhao H., Yu L., Tang X.* // *Chembiochem.* 2021. V. 22. P. 1901–1907. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000763>

Photocaged Small Interfering RNA

E. A. Akhmetova*, D. V. Kim*, A. S. Dome*, M. I. Meschaninova*, and D. S. Novopashina*. **, #

Phone: +7 (343) 363-51-29; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8,
Novosibirsk, 630090 Russia

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

Photoregulated systems are interesting and prospective instruments for the influence on gene expression. In present work the approach for the synthesis of photoregulated siRNA for activatable by light irradiation RNA interference is proposed. siRNA temporary block by introduction of bulky group through of the photolabile linker. The attachment of ligand was carried out by the activation of 5'-terminal hydroxyl using disuccinimidyl carbonate with subsequent interaction with amino containing ligand. We used aminomodified cholesterol and trileucine as bulky ligands. Effective remove of ligands introduced through the photocleavable linker by UV-irradiation was demonstrated. Using the proposed approach siRNA bearing cholesterol residues at 5'-terminus of sense- and/or antisense-chains targeted to EGFP mRNA (enhanced green fluorescent protein) were synthesized. The possibility of photoinduced inhibition of *EGFP* gene expression into the cells HEK293FT stably expressed EGFP was shown.

Keywords: photocleavable linker, photoactivatable siRNA, cholesterol conjugates, green fluorescent protein