

На правах рукописи

КРАШЕНИНИНА ОЛЬГА АЛЕКСЕЕВНА

**НОВЫЕ ПИРЕНИЛЬНЫЕ ЭКСИМЕР-ОБРАЗУЮЩИЕ ЗОНДЫ НА
ОСНОВЕ ОЛИГО(2'-*O*-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ) ДЛЯ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ РНК**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2017

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время для определения последовательности, структуры, количества и функций НК в клетках все более широкое распространение получают различные методы с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, обладающих высоким сродством к НК-мишеням, повышенной устойчивостью к действию экзо- и эндонуклеаз и значительной чувствительностью флуоресценции к связыванию с молекулой-мишенью.

Несмотря на достаточно большое число известных флуоресцентных зондов для детекции НК (см., например, обзор *Guo J. et al. Anal. Bioanal. Chem., 2012*), до сих пор постоянно растет интерес к разработке новых зондов с улучшенными и контролируемыми свойствами. В каждом конкретном случае для того, чтобы контролировать гибридизационные свойства, а также возникновение и интенсивность специфического сигнала зондов в комплексе с мишенью, при дизайне зондов необходимо принимать во внимание структурные особенности НК-мишеней, флуоресцентной метки и образующегося гибридного дуплекса. Использование пиренильных зондов для исследования структуры и функций нуклеиновых кислот, а также их количественного определения в растворе и визуализации в клетках весьма перспективно. Актуальным, на наш взгляд, является разработка простых универсальных подходов к получению пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих остатки пирена в заданных положениях олигонуклеотидной цепи. Разработке таких подходов, а также исследованию и применению созданных с использованием этих подходов зондов посвящена данная диссертация.

Целью данной работы являлось создание и изучение свойств новых эксимер-образующих флуоресцентных зондов трех типов, а именно линейных зондов, tandemных зондов и зондов типа «молекулярный маяк» на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), а также демонстрация возможности использования этих зондов для эффективной и специфичной детекции РНК-мишеней.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить ряд **задач**:

1. Разработать метод синтеза конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с одиночными и множественными 2'-биспиренильными группировками и 3'-концевым «инвертированным» тимидином. Получить серию линейных зондов, комплементарных участкам 120-137 и 315-336 мРНК гена *mdr1*. Исследовать физико-химические и биологические свойства 2'-биспиренильных зондов.

2. Осуществить дизайн и синтез tandemных зондов, содержащих два монопиренильных остатка на стыке компонентов тандема, отличающихся структурой и длиной линкеров и комплементарных участку 2326-2357 28S рибосомальной РНК. Исследовать их физико-химические свойства.

3. Осуществить дизайн и синтез зондов типа «молекулярный маяк», содержащих биспиренильную группировку и тушитель ВНQ1 на противоположных концах олигонуклеотидной последовательности и комплементарных участкам 28S рибосомальной РНК. Исследовать их физико-химические свойства.

4. Исследовать возможность использования новых зондов для детекции протяженных РНК в растворе и визуализации внутриклеточных РНК.

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе созданы новые сиквенс-специфичные эксимер-образующие флуоресцентные зонды трех типов (линейные, тандемные и зонды типа «молекулярный маяк») на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции РНК. Отобраны высокочувствительные зонды оптимального строения, связывание которых с РНК-мишенью вызывает появление специфического флуоресцентного сигнала эксимера пирена высокой интенсивности. Выявлены структурные особенности предложенных зондов и их комплексов с РНК, влияющие на эффективность образования эксимера пирена и интенсивность эксимерной флуоресценции. На основе данных о термической стабильности комплексов зондов с НК-мишенями и, в случае тандемных зондов, данных молекулярно-динамических расчетов проведен детальный анализ структуры этих комплексов. Продемонстрирована применимость линейных зондов для детекции протяженной РНК в растворе на примере 678-звенного 5'-концевого фрагмента PGY1/MDR1 мРНК. Продемонстрирована применимость тандемных зондов и зондов типа «молекулярный маяк» для визуализации внутриклеточной РНК на примере 28S рибосомальной РНК в фиксированных клетках линии HEK293 Phoenix. Полученные результаты могут быть использованы при создании эффективных инструментов для детекции и визуализации специфических РНК-мишеней, а также могут служить основой для разработки новых высокочувствительных биосенсоров. Разработанные синтетические подходы могут быть адаптированы к синтезу других конъюгатов олигонуклеотидов с целью получения молекулярно-биологических инструментов и терапевтических агентов нового поколения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Созданы новые линейные эксимер-образующие флуоресцентные зонды на основе конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с одиночными и множественными (до трех) 2'-биспиренильными группировками и 3'-концевым «инвертированным» тимидином, комплементарных участкам 120-137 и 315-336 мРНК гена *mdr1*. Выявлено влияние локального окружения модифицированных нуклеотидов, а именно нуклеотидного контекста, на интенсивность эксимерной флуоресценции комплексов зондов с РНК-мишенью.

2. Проведен рациональный дизайн и детальное исследование физико-химических свойств новых эксимер-образующих тандемных зондов,

комплементарных участку 2326-2357 28S рРНК и представляющих собой пару олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 5'- или 3'-концевыми монопиренильными остатками «на стыке», введенными посредством линкеров различной длины и строения. Выявлено влияние длины линкеров на эффективность образования эксимера пирена при связывании зондов с РНК. Построены МД-траектории и рассчитаны распределения вероятностей образования пиренильных димеров при образовании комплексов tandemных зондов с РНК-мишенью.

3. Созданы новые флуоресцентные зонды типа «молекулярный маяк», представляющие собой олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), комплементарные 28S рРНК, содержащие биспиренильную группировку на 5'-конце и тушитель флуоресценции ВНQ1 на 3'-конце. Проведено сравнительное исследование флуоресценции зондов, различающихся расстоянием биспиренильной группировки от РНК-мишени после образования гибридационного комплекса.

4. Продемонстрирована возможность визуализации 28S рРНК в клетках с использованием созданных tandemных зондов и зондов типа «молекулярный маяк», что свидетельствует об их перспективности в качестве высокоселективных инструментов детекции внутриклеточных РНК.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертации опубликованы 4 экспериментальные статьи и 1 обзор в международных рецензируемых научных журналах, а также тезисы международной конференции в издании, индексируемом базой Web of Science. Результаты работы апробированы на следующих международных научных конференциях: 22nd International Roundtable of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Париж, Франция, 2016), «Химическая биология – 2016» (Новосибирск, Россия, 2016), 21st International Roundtable of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Познань, Польша, 2014), Молодёжь третьего тысячелетия: XXXVI Международная научная конференция с элементами научной школы для молодёжи (Омск, Россия, 2012), XX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Монреаль, Канада, 2012), 7th Annual meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (Копенгаген, Дания, 2011), «Физико-химическая биология» (Новосибирск, Россия, 2011).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 174 страницах, содержит 60 рисунков, 31 схему и 24 таблицы. Библиография включает 254 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В рамках данной работы в качестве флуоресцентных зондов для детекции протяженных РНК нами были созданы три варианта конструкций на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), а именно: (i)

линейные мультипиренильные зонды, содержащие от одной до трех вставок 2'-биспиренилметилфосфодиамидных производных рибонуклеозидов (А, G, U и С), (ii) тандемные зонды, представляющие собой систему из двух монопиренильных конъюгатов, и (iii) «молекулярные маяки», содержащие 5'-концевую биспиренилметилфосфодиамидную группировку и тушитель ВНQ1 на 3'-конце. В качестве мишеней нами были выбраны участки мРНК гена множественной лекарственной устойчивости *mdr 1* (нуклеотиды 120-137 и 315-336) и 28S рибосомальной РНК (нуклеотиды 2319-2361).

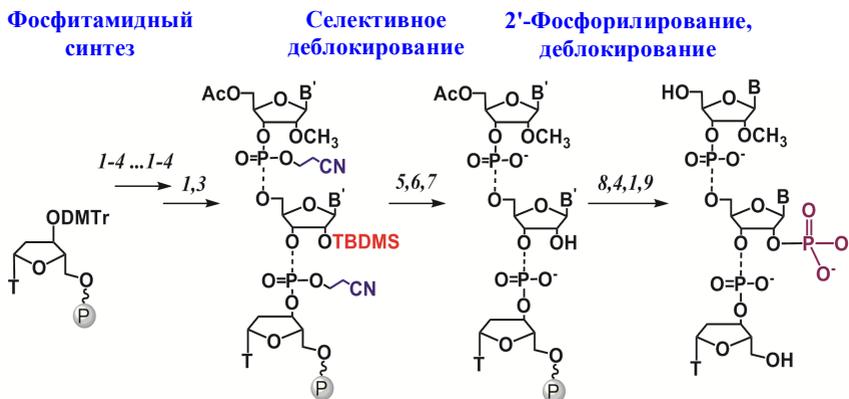
1.1. Линейные зонды на основе 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов)

При конструировании олигонуклеотидных производных важно выбрать такое положение, модификация которого влияла бы наименьшим образом на способность образовывать стабильные дуплексы с комплементарными мишенями. С этой точки зрения, наиболее перспективными модификациями являются введение функциональных групп в 2'-положение углеводного фрагмента нуклеозидов, а также концевые модификации, так как искажения в структуре НК-дуплекса при этом оказываются минимальными. Для получения линейных мультипиренильных зондов на основе 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) нами была предложена универсальная синтетическая стратегия, подразумевающая функционализацию любого из четырех нуклеотидов через 2'-фосфат. Данная стратегия позволяет 1) синтезировать 2'-фосфорилированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) без использования предварительно синтезированных модифицированных нуклеотидных синтонов, 2) ввести два остатка пирена в 2'-положение нуклеозида (U, C, A или G) через 2'-фосфат, а также 3) получить мультипиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащие несколько 2'-биспиренильных группировок. Для повышения устойчивости к деградации нуклеазами мы дополнительно модифицировали 2'-биспиренильные зонды путем введения тимидина на 3'-конец посредством терминальной 3'-3'-межнуклеозидной фосфодиэфирной связи (3'-концевой «инвертированный» тимидин).

Синтез 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих «инвертированный» тимидин на 3'-конце, осуществляли согласно представленной схеме (Схема 1). На первом этапе твердофазным автоматическим фосфитамидным методом с использованием полистирольного носителя с присоединенным через 5'-гидроксил 3'-*O*-диметокситритилтимидином получали полимерсвязанные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), содержащие вставку (или вставки) 2'-*O*-*mpem*-бутилдиметилсилил-защищенного рибонуклеозида (U, C, A или G). Затем проводили стадии селективного деблокирования 2-цианэтильных и 2'-*O*-*mpem*-бутилдиметилсилильных защитных групп. Последующее твердофазное 2'-

фосфорилирование осуществляли как стандартный цикл фосфитамидного синтеза с использованием фосфитамида диметокситритилсульфонилдиэтанола при активации 5-этилтиотетразолом (время конденсации – 30 мин). Финальное деблокирование и отделение 2'-фосфорилированного олигонуклеотида от полимерного носителя проводили в стандартных условиях. Структуру полученных 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) подтверждали с помощью MALDI TOF-масс-спектрометрии.

Схема 1

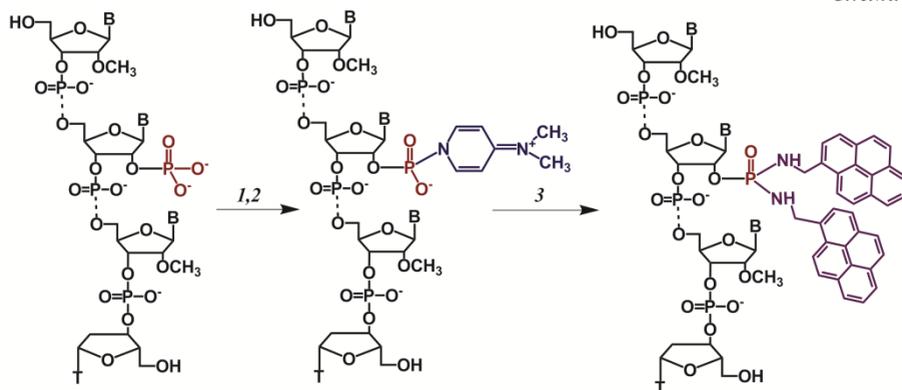


(1) 3% $\text{CHCl}_2\text{CO}_2\text{H}$ в CH_2Cl_2 ; (2) 2'-*O*-TBDMS-защищенный или 2'-*O*-метил-РНК фосфитамид, 5-(этилтио)-1*H*-тетразол, CH_3CN абс.; (3) *N*-метилимидазол в THF, $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ и 2,6-лутидин в THF; (4) I_2 в THF:Py:H₂O (90:1:9); (5) смесь *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамид:THF (1:1), 25 °С, 30 мин; (6) 5% 1,8-дiazобисцикло[5.4.0]ундец-7-ен в смеси *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамид:THF (1:1), 25 °С, 30 мин; (7) *N*-метил-2-пирролидинон, TEA, TEA:3HF, 65 °С, 2 ч; (8) 2[2-(4,4'-диметокситритилокси)-этилсульфонил]-этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамид, 5-(этилтио)-1*H*-тетразол, 30 мин, CH_3CN абс.; (9) 40% CH_3NH_2 водн., 65 °С, 15 мин.

Ⓟ: модифицированный полистирольный носитель, В'-защищенное гетероциклическое основание.

Для введения биспиренильной группы в 2'-положение олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) нами был выбран удобный постсинтетический подход, основанный на активации фосфата в составе незащищенного олигонуклеотида с использованием окислительно-восстановительной пары трифенилфосфин/дипиридилдисульфид в присутствии 4-диметиламинопиридина как нуклеофильного катализатора (см. обзор Zarytova V., Ivanova E., Venyaminova A., *Nucleosides Nucleotides*, 1998), с последующим взаимодействием с 1-пиренилметиламином (Схема 2). Структуру полученных 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) подтверждали с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии, ОФ ВЭЖХ, УФ- и флуоресцентной спектроскопии.

Была продемонстрирована устойчивость 2'-биспиренильных производных олигонуклеотидов к действию нуклеаз сыворотки в течение 24 часов.



(1) Трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид, DMSO абс.; (2) 4-диметиламинопиридин, DMSO абс., 56 °С, 15 мин; (3) гидрохлорид 1-пиренилметиламина, $(C_2H_5)_3N$, DMSO абс., 56 °С, 2 ч. В - незашитенное гетероциклическое основание, Т – тимин.

В рамках описанной выше стратегии нами были синтезированы две серии линейных зондов (**1L1**)-(**1L18**) и (**2L1**)-(**2L8**), комплементарных участкам мРНК гена *mdr1* (нуклеотиды 120-137 и 315-336, соответственно).

На следующем этапе нами было проведено изучение комплексообразующих свойств синтезированных конъюгатов методом термической денатурации дуплексов (совместно с к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым, ЛБМХ ИХБФМ СО РАН). В качестве РНК-мишеней были использованы олигорибонуклеотиды **RNA1** (для **1L1-1L18**) и **RNA2** (для **2L1-2L8**), соответствующие фрагментам мРНК гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1* (нуклеотиды 113-137 и 315-336, соответственно). Было показано, что введение фосфатных групп в 2'-положение рибозы приводит к незначительному понижению термической стабильности дуплекса, что может быть вызвано электростатическим отталкиванием вследствие введения дополнительных отрицательных зарядов (данные не приведены). Введение двух остатков пирена через 2'-фосфат в большинстве случаев приводило к уменьшению стабильности дуплексов с модельными короткими РНК (**RNA1** и **RNA2**) и увеличению термической стабильности дуплексов с их ДНК-аналогами. В качестве примера в таблице 1 представлены данные для одной из серий зондов, комплементарных участку 113-137 мРНК гена *mdr1*. Наибольшую дестабилизацию дуплекса с модельной РНК наблюдали при введении 2'-биспиренильного нуклеотида в середину олигонуклеотидной цепи: в таком случае разница температур плавления составляла $-4.2-9.2$ °С, что, вероятно, связано с потерей некоторых водородных

связей в дуплексе вследствие стерических затруднений, вызванных введением в 2'-положение громоздких гидрофобных пиренильных групп, которые стремятся разместиться вне плотного дуплекса А-типа.

Таблица 1. Термическая стабильность дуплексов 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих 3'-концевой «инвертированный» тимидин, с модельными короткими РНК- и ДНК-мишенями

№	Последовательность ¹ , 5'-3'	+RNAI		+DNAI	
		T _m , °C	ΔT _m /мод., °C ²	T _m , °C	ΔT _m /мод., °C ²
IL1	5'-m(GACC ^{βPYR} UCGCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	82.5	-2.9	61.7	-1.0
IL2	5'-m(GACCUCGCGCUC ^{βPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	83.5	-1.9	61.6	-1.1
IL3	5'-m(GACC ^{UβPYR} CGCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	81.2	-4.2	61.5	-1.2
IL4	5'-m(GACCUCGCGCUCCU ^{βPYR} GGA) _{3'-3'} dT	82.4	-3.0	60.1	-2.6
IL9	5'-m(GACC ^{βPYR} UCGCGCUC ^{βPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	79.5	-3.0	59.8	-1.1
IL11	5'-m(GACCUCGCGCU ^{βPYR} ^{βPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	80.7	-2.3	60.4	-0.8
IL12	5'-m(GACC ^{βPYR} UCGCG ^{βPYR} UC ^{βPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	67.8	-5.9	54.8	-2.4
IL13	5'-m(GACC ^{βPYR} UCGCGCU ^{βPYR} ^{βPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	68.0	-5.8	55.4	-2.2
IL14	5'-m(GACC ^{UβPYR} CGCGCUCCU ^{βPYR} GGA) _{3'-3'} dT	77.9	-3.8	61.8	-0.1
IL16	5'-m(GACCUCGCGCUCC ^{UβPYR} ^{βPYR} GGA) _{3'-3'} dT	87.1	+0.9	65.9	+2.0
IL17	5'-m(GACC ^{βPYR} CGCGC ^{UβPYR} CCU ^{βPYR} GGA) _{3'-3'} dT	67.4	-6.0	60.0	-0.7
IL18	5'-m(GACC ^{UβPYR} CGCGCUCC ^{UβPYR} ^{βPYR} GGA) _{3'-3'} dT	75.2	-3.4	55.1	-2.3

¹ N^{βPYR} – 2'-биспиренилметилфосфодиамидное производное рибонуклеозида (С или U), m – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид), _{3'-3'}dT – «инвертированный» тимидин.

² ΔT_m/мод. – разница в термической стабильности дуплексов конъюгата и немодифицированного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) IL с НК-мишенями в расчете на одну модификацию.

RNAI: 5'-r(UGGCCGUUCCAAGGAGCGGAGGUC), **DNAI:** 5'-d(TGGCCGTTCCAAGGAGCGCGA GGTC). Условия: 0.1 M NaCl, 10 mM какодилат Na, pH 7.4, 1 mM Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 200 нМ

В случае же дуплексов 2'-биспиренильных конъюгатов с ДНК-мишенями остатки пирена, очевидно, интеркалируют в дуплекс, стабилизируя его (мы наблюдали значительное увеличение температуры плавления дуплексов вплоть до +6.4 °C). Выявлено, что введение двух 2'-биспиренильных групп в соседствующие нуклеозиды в меньшей степени дестабилизирует дуплексы зондов с НК-мишенями (ΔT_m в расчете на модификацию составляла от +0.9 до -2.3 °C), по сравнению с введением 2'-биспиренильных групп в отдаленные друг от друга нуклеозиды олигонуклеотидной цепи (ΔT_m в расчете на модификацию была -3.0-3.8 °C). Введение трех гидрофобных модификаций в олигонуклеотидную цепь резко уменьшало термическую стабильность дуплексов конъюгатов с НК-мишенями, причем наибольшая дестабилизация дуплексов была в случае конъюгатов, модифицированные нуклеозиды которых

находились в середине цепи (ΔT_m в расчете на модификацию достигала -6.0 °C) (Табл.1).

Тем не менее, стоит отметить, что все полученные в работе 2'-биспиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метирибонуклеотидов) образуют достаточно стабильные дуплексы с соответствующими НК-мишенями.

Далее мы провели сравнительное исследование флуоресцентных свойств 2'-биспиренильных линейных зондов и их дуплексов с короткими ДНК- и РНК-мишенями, а также с 678-звенным 5'-концевым фрагментом PGY1/MDR1 мРНК (*RNA3*) с известной вторичной структурой (*Kostenko E. et al., FEBS Lett., 2000*).

В спектрах флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов наблюдали два хорошо структурированных пика с максимумами при 378 и 391 нм, соответствующих колебательным полосам I и III мономера пирена и, в некоторых случаях, широкую неструктурированную полосу флуоресценции пиренового эксимера при 460-510 нм (см., напр., Рис. 1). При гибридизации зондов, содержащих одну 2'-биспиренильную группу, с короткими РНК-мишенями в большинстве случаев наблюдали увеличение мономерной флуоресценции пирена, а в некоторых случаях многократное увеличение интенсивности пиренильной эксимерной флуоресценции (до 21 раза). Практически во всех случаях эксимерная флуоресценция при гибридизации с короткой РНК-мишенью была выше, чем с короткой ДНК-мишенью. Нами было выявлено, что природа пары нуклеотидов с 3'-стороны от 2'-модифицированной вставки играет ключевую роль, при этом оптимальными парами с 3'-стороны являются CC, CG и UC.

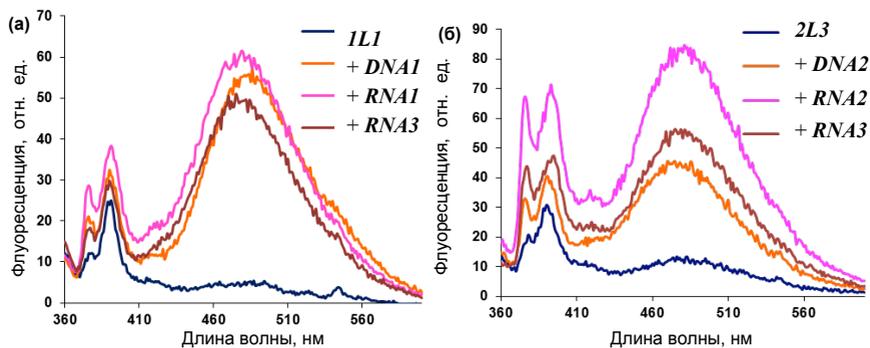


Рис. 1. Спектры испускания флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов *IL1* (а), *2L3* (б) и их дуплексов с НК-мишенями. Спектры записаны при 25 °C и длине волны возбуждения флуоресценции 345 нм в буфере 0.1 M NaCl, 10 mM какодилат Na, pH 7.4, 1 mM Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 100 нМ. *RNA1*: 5'-г(UGGCCGUUCCAAGGAGCGCGAGGUC), *RNA2*: 5'-г(UCAUCCAUGGGGCGUGGACUCCU).

Аналогичные закономерности наблюдали при связывании зондов с протяженной РНК-мишенью, однако интенсивность эксимерной флуоресценции была ниже.

В спектрах испускания флуоресценции 2'-биспиренильных зондов, содержащих две или три 2'-биспиренильные группы, наблюдали увеличение эксимерной флуоресценции с ростом числа 2'-биспиренильных группировок. Мы ожидали, что при увеличении количества пиренильных остатков в составе зонда изменения в спектрах флуоресценции зондов при связывании с РНК-мишенью будут выражены сильнее. Однако, при гибридизации этих зондов с модельными РНК-мишенями интенсивность эксимерной флуоресценции в спектрах была сопоставима с той, что была зарегистрирована в случае зондов с одной 2'-биспиренильной группой.

Изучение гибридизационных свойств зондов проводили методом флуориметрического титрования, основанном на изменении интенсивности флуоресценции пиренильных зондов при образовании комплексов с комплементарной НК-мишенью. Значения эффективных констант ассоциации 2'-биспиренильных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с соответствующими НК-мишенями, рассчитанные с использованием модифицированного уравнения Штерна-Фольмера, были высокими (10^7 - 10^8 л/моль). Из полученных результатов можно заключить, что предложенные нами зонды обладают высоким сродством к НК-мишеням (в том числе и к протяженной РНК).

Совокупность результатов, полученных в ходе исследования физико-химических и биологических свойств нового варианта линейных зондов, подтверждает перспективность использования созданных нами 2'-биспиренильных конъюгатов 3'-«инвертированных» олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для селективной детекции протяженных фрагментов РНК в растворе.

2.2. Тандемные зонды, состоящие из 3'- и 5'-монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов)

Среди флуоресцентных зондов на основе пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов особый интерес представляют эксимер- формирующие тандемные зонды, которые обладают повышенной селективностью к НК-мишени, так как в этом случае специфический сигнал может возникнуть только вследствие строгого позиционирования молекул флуорофора с образованием эксимера в результате связывания двух компонентов зонда с НК-мишенью. Нами был предложен дизайн новых тандемных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), компоненты которых содержат остатки пирена, введенные в олигонуклеотидную цепь посредством линкеров различной длины и строения (Рис. 2). В качестве модельной РНК-мишени (***RNA4***) был выбран 43-звенный фрагмент 28S рибосомальной РНК человека (нуклеотиды 2319-2361) и

мышь (остатки 2096-2138) (оба фрагмента длиной 43 нт имеют одинаковую последовательность).

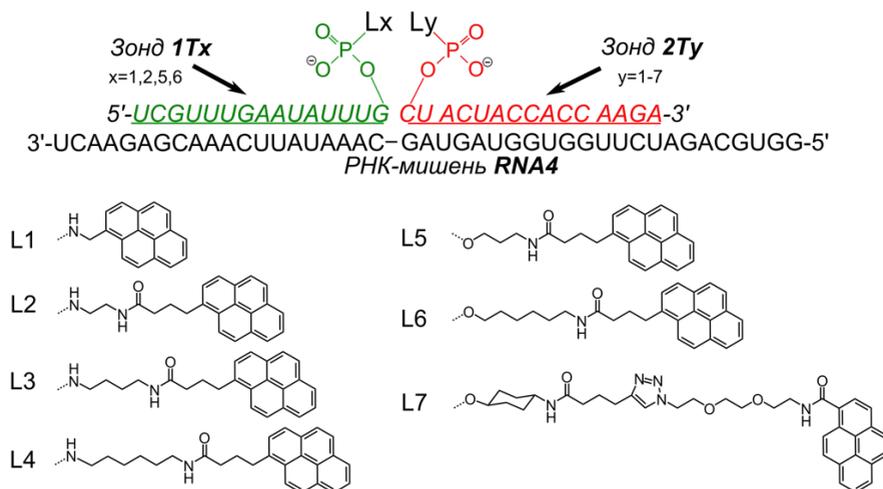


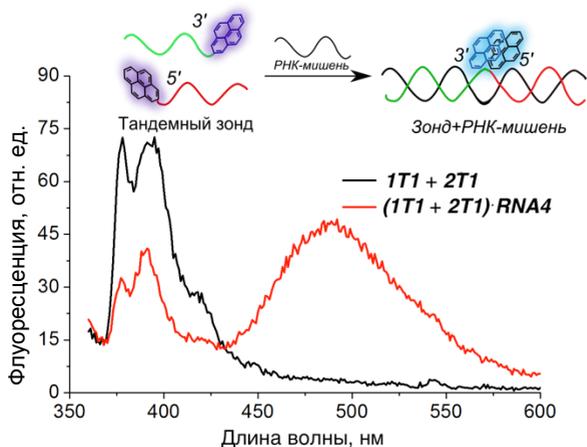
Рис. 2. Схематическое представление РНК-направленных эксимер-формирующих tandemных зондов, предложенных в данной работе. Зонды **1Tx** и **2Ty** – компоненты tandemных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) зондов, несущие 3'- или 5'-концевые пиренильные группы, введенные посредством линкеров (**Lx** и **Ly**, соответственно) различного строения.

К преимуществам синтеза олигонуклеотидов, содержащих концевые модификации, можно отнести большое разнообразие существующих химических подходов и достаточно большой выбор различных линкеров, посредством которых возможно введение необходимых функциональных групп. Введение пиренильных группировок по концам олигонуклеотидов осуществляли описанными ранее методами. Строение полученных монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) подтверждали с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии, ОФ ВЭЖХ, УФ- и флуоресцентной спектроскопии.

Для выявления влияния пирена и кооперативных взаимодействий на термическую стабильность дуплексов tandemных зондов с РНК-мишенями нами было проведено детальное исследование термической стабильности дуплексов tandemных зондов и их компонентов с модельной РНК-мишенью (**RNA4**) (совместно с к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым, ЛБМХ ИХБФМ СО РАН). Введение пиренильных остатков на 3'-конец зондов **1Tx** приводит к значительному увеличению термической стабильности дуплексов **1Tx-RNA4** ($\Delta T_{\max} = +3.7-4.3$ °С, по сравнению с немодифицированным дуплексом **1T-RNA4** с $T_{\max} = 53.4$ °С), а также существенно стабилизирует **1Tx+2T**·**RNA4** часть дуплекса (**1Tx+2T**)·**RNA4** ($\Delta T_{\max} = \sim +5$ °С по сравнению с **(1T+2T)**·**RNA4** с $T_{\max 1} = 58.5$ °С и $T_{\max 2} = 65.4$ °С),

приводя к практически одновременной диссоциации компонентов tandemного зонда, что свидетельствует о наличии дополнительных стабилизирующих взаимодействий. В случае дуплексов 5'-пирен-меченых олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) **2Tu** с РНК-мишенью, значения T_{max} возрастают для зондов с гибкими линкерами **L1-L6** ($\Delta T_{max} = +1.4-3.2$ °C по сравнению с дуплексом **2T-RNA4** с $T_{max} = 67.0$ °C) и уменьшаются для зонда с длинным жестким линкером **L7** ($\Delta T_{max} = -0.6$ °C). Введение остатка пирена в 5'-модифицированный компонент tandemного зонда стабилизирует часть **2T-RNA4** дуплекса (**1T+2Tu**)·**RNA4**, в результате чего происходит двухстадийное плавление дуплекса (бифазный переход с $T_{max1} = 55.9-58.5$ °C и $T_{max2} = 65.6-68.4$ °C). Кроме того, было показано, что кооперативные взаимодействия стабилизируют **1T-RNA4** часть дуплекса ($\Delta T_{max} = +5.1$ °C) и дестабилизируют **2T-RNA4** часть ($\Delta T_{max} = -1.6$ °C).

На следующем этапе работы мы исследовали влияние длины и структуры линкеров 3'- и 5'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) – компонентов tandemных зондов, на эффективность формирования эксимера при связывании зондов с **RNA4**. Для этого были записаны спектры испускания флуоресценции всех 28 созданных вариантов tandemных зондов в присутствии и в отсутствие РНК-мишени (см., например, Рис. 3). Для целого ряда tandemных зондов наблюдали появление интенсивной эксимерной флуоресценции при гибридизации с РНК. Выяснилось, что наибольшую интенсивность эксимерной флуоресценции при связывании с РНК демонстрируют зонды, 3'-модифицированный компонент которых представлен пиренильным конъюгатом **1T1**, содержащим самый короткий линкер **L1**.



С целью интерпретации полученных результатов, были построены молекулярно-динамические (МД) модели дуплексов tandemных зондов с РНК-

мишенью в явной водной оболочке с использованием программного пакета AMBER12 (моделирование выполнено к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым). Для того, чтобы исследовать динамику ассоциации и диссоциации пиренильных остатков в дуплексах тандемных зондов с РНК, МД-симуляции запускали начиная с разведенных пиренильных остатков в стыке дуплекса (красная кривая) и начиная с заранее сформированного пиренильного димера (синяя кривая) (Рис. 4).

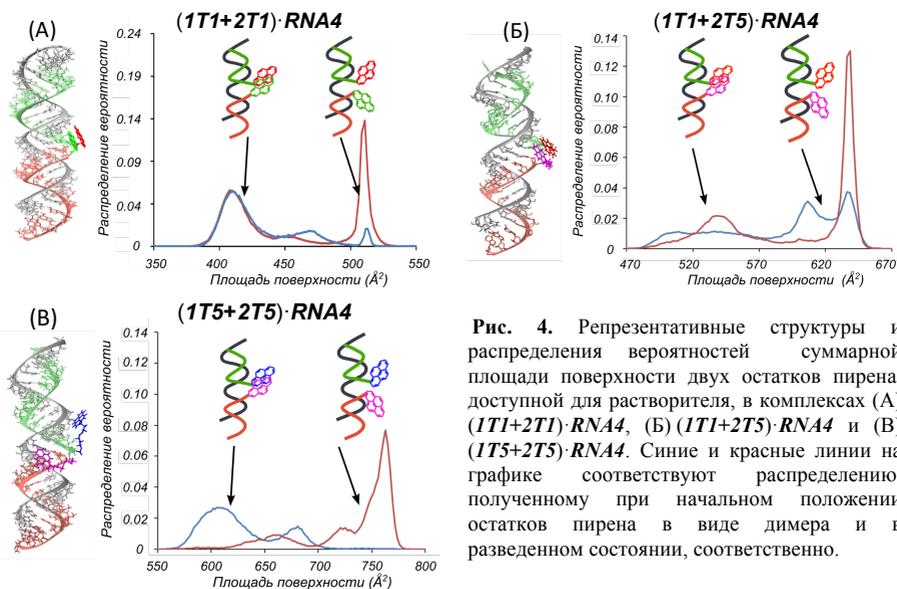


Рис. 4. Репрезентативные структуры и распределения вероятностей суммарной площади поверхности двух остатков пирена, доступной для растворителя, в комплексах (А) $(1T1+2T1)\cdot RNA4$, (Б) $(1T1+2T5)\cdot RNA4$ и (В) $(1T5+2T5)\cdot RNA4$. Синие и красные линии на графике соответствуют распределению, полученному при начальном положении остатков пирена в виде димера и в разведенном состоянии, соответственно.

Анализ МД-траекторий дуплексов $(1T1+2T1)\cdot RNA4$ и $(1T1+2T5)\cdot RNA4$ показал, что формирование и распад пиренового димера может происходить при обоих начальных условиях. Вероятность образования димера выше в случае первого комплекса. В случае дуплекса $(1T5+2T5)\cdot RNA4$ разнесение пиренильных остатков в начале (красная кривая) приводит к взаимодействию остатков пирена с малой бороздкой дуплекса, а вероятность ассоциации пиренильных остатков в димер драматически низкая. Таким образом, полученные МД-траектории и распределения вероятностей согласуются с наблюдаемыми спектрами флуоресценции и поглощения дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью.

Демонстрацию возможности использования предложенных тандемных зондов для визуализации внутриклеточной РНК проводили с использованием клеточной линии HEK293 Phoenix методом FISH РНК (совместно к.б.н. В.С. Фишманом, ИЦИГ СО РАН) (Рис. 5).

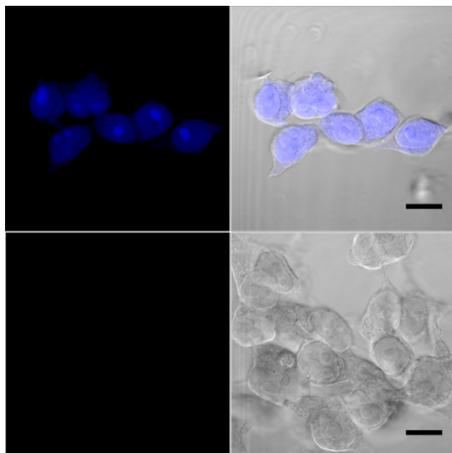


Рис. 5. Визуализация внутриклеточной 28S рибосомальной РНК с использованием тандемных пирен-меченых зондов (*1T1+2T1*) в фиксированных клетках линии НЕК293 Phoenix, не обработанных (сверху) и обработанных (снизу) РНКазой А. Слева канал эксимерной флуоресценции пирена (длина волны возбуждения 405 нм, детекцию флуоресцентного отклика проводили в диапазоне длин волн 450–495 нм), справа объединенный канал (канал эксимерной флуоресценции + фазовый контраст).

В случае тандемных зондов (*1T1+2T1*) и (*1T1+2T4*), как и ожидалось, мы наблюдали интенсивное испускание эксимерной флуоресценции в ядрышках и цитоплазме. Обработка фиксированных клеток зондами с низким соотношением сигнал/шум, например (*1T2+2T6*), не приводила к появлению флуоресцентного сигнала (данные не приведены). Мы не наблюдали фоновой флуоресценции или автофлуоресценции фиксированных клеток при отсутствии зондов. Для подтверждения специфического связывания тандемных зондов с РНК-мишенью фиксированные клетки обрабатывали РНКазой А, промывали и затем инкубировали с тандемными зондами.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что созданные тандемные зонды могут быть использованы для специфической детекции внутриклеточных РНК-мишеней.

2.3. Зонды типа «молекулярный маяк» на основе 5'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов), содержащих тушитель ВНQ1 на 3'-конце

Одним из удачных примеров создания зондов на основе нуклеиновых кислот являются так называемые «молекулярные маяки» (МВ – molecular beacon). Классическим примером зондов такого типа являются олигонуклеотиды, образующие структуру типа «стебель-петля» и несущие флуорофор на одном из концов и тушитель флуоресценции - на другом. В отсутствие мишени флуорофор и тушитель флуоресценции пространственно сближены, и происходит тушение флуоресценции. При связывании зондов с мишенью, благодаря конформационным изменениям, флуорофор и тушитель удаляются друг от друга, что сопровождается появлением флуоресцентного сигнала.

Перспективным направлением в области конструирования «молекулярных маяков» является создание структур, содержащих несколько флуорофоров.

Нами были предложены в качестве зондов типа «молекулярный маяк» 5'-биспиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащие тушитель на 3'-конце (Рис. 6А). В качестве тушителя флуоресценции был выбран ВНQ1 (Black Hole Quencher 1), так как полоса поглощения этого хромофора (~450-600 нм, λ_{max} 534 нм) перекрывается с областью испускания эксимерной флуоресценции пирена (~420-560 нм), обеспечивая её эффективное тушение. В качестве модельной РНК-мишени (*RNA4*) был выбран 43-звенный фрагмент 28S рибосомальной РНК человека (нуклеотиды 2319-2361) и мыши (остатки 2096-2138) (оба фрагмента длиной 43 нт имеют одинаковую последовательность).

Синтезированные зонды типа «молекулярный маяк» *MB1-MB4* различались: 1) длиной свисающего одноцепочечного участка (0, 1 и 3 нт), образующегося при гибридизации зонда с мишенью и несущего два остатка пирена; 2) длиной участка для гибридизации с РНК-мишенью (15 и 19 нт) и 3) количеством пар нуклеотидов, образующих «стебель» (5 и 6 п.о.) (Рис. 6Б).

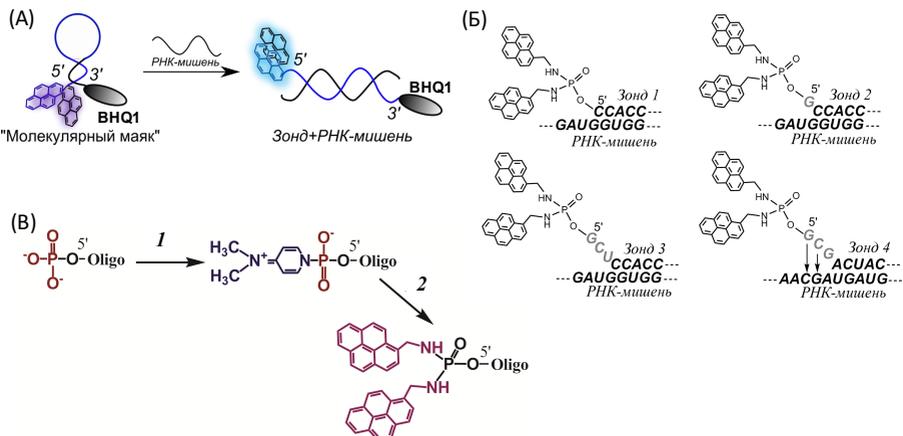


Рис. 6. (А) Принцип действия зондов *MB1-MB4*. (Б) Фрагменты структуры комплексов зондов с РНК-мишенью (*RNA4*). Нуклеотиды свисающего одноцепочечного участка изображены серым цветом. (В) Синтез 5'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов): 1) трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид, 4-*N,N'*-диметиламинопиридин, DMSO, 56 °С, 15 мин; 2) гидрохлорид 1-пиренилметиламина, (C₂H₅)₃N, DMSO, 56 °С, 2 ч. Oligo – деблокированный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид).

Получение 5'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) проводили как описано ранее в работах (*Kostenko E. et al., NAR, 2001; Новопашина Д.С. и др., Биооргани. химия 2008*) (Рис. 6В). Структуру конъюгатов подтверждали методами MALDI-TOF масс-спектрометрии, а также УФ- и флуоресцентной спектроскопии.

Для сравнительного исследования физико-химических свойств созданных зондов типа «молекулярный маяк» были синтезированы две дополнительные серии 5'-биспиренильных зондов. Первая серия представляла собой зонды **H1-H4** без тушителя, а вторая – укороченные с 3'-конца зонды **LPI-LP4**, которые не содержали тушителя и не образовывали вторичной структуры «стебель-петля» (Рис. 7А).

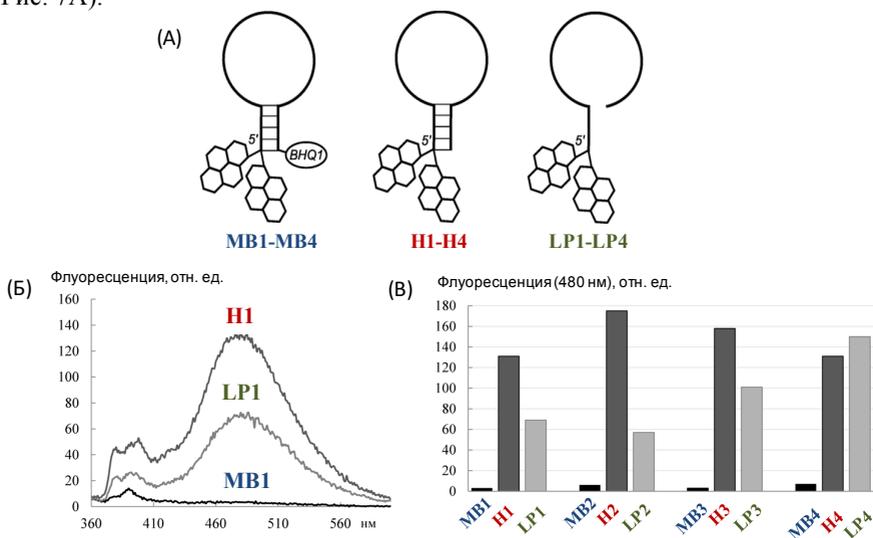


Рис. 7. (А) Схематическое представление синтезированных зондов **MB1-MB4**, **H1-H4** и **LPI-LP4**. (Б) Спектры флуоресценции 5'-биспиренильных зондов **MB1**, **H1** и **L1**. (В) Интенсивность эксимерной флуоресценции (длина волны 480 нм) зондов **MB1-MB4**, **H1-H4** и **LPI-LP4**. Условия: 25°C, длина волны возбуждения флуоресценции 345 нм, буфер 10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 100 мМ NaCl, 1 мМ Na₂ЭДТА, концентрация 5'-биспиренильных зондов и РНК-мишени 1·10⁻⁶ М.

На следующем этапе проводили сравнительное изучение спектральных свойств зондов типа «молекулярный маяк» **MB1-MB4** и синтезированных 5'-биспиренильных зондов **H1-H4** и **LPI-LP4**, не содержащих тушителя на 3'-конце. В спектрах испускания флуоресценции зондов **MB1-MB4** не наблюдали пика эксимерной флуоресценции пирена, а интенсивность двух пиков с максимумами при 378 и 391 нм была пренебрежимо мала, при этом зонды **H1-H4** и **LPI-LP4** демонстрировали высокую интенсивность мономерной и эксимерной флуоресценции (Рис. 7Б и В). Полученные результаты свидетельствуют об эффективном тушении мономерной и эксимерной флуоресценции пирена в присутствии BHQ1 в случае зондов **MB1-MB4**.

При гибридизации 5'-биспиренильных зондов **MB1-MB4** с РНК-мишенью наблюдали увеличение интенсивности испускания флуоресценции пирена (Рис.

8). Во всех случаях происходило значительное увеличение мономерной флуоресценции пирена, при этом изменения эксимерной флуоресценции зависели от структуры комплекса зонд/РНК-мишень. Так, при связывании «молекулярных маяков» **MB2** и **MB3** с РНК-мишенью образовывались комплексы, в которых 5'-биспиренильная группировка располагалась на «свисающем» конце зонда и была удалена от дуплекса зонд/РНК-мишень на 1 и 3 нт, соответственно. В этих случаях практически не происходило увеличения эксимерной флуоресценции пирена.

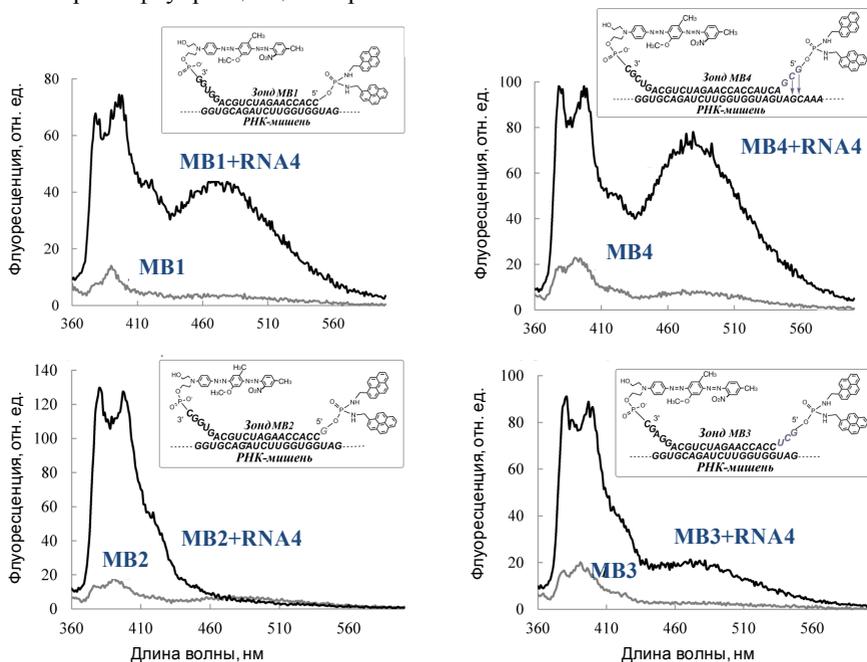


Рис. 8. Изменение спектров флуоресценции зондов типа «молекулярный маяк» **MB1- MB4** при гибридизации с РНК-мишенью. Условия см. подпись к рисунку 7.

Связывание с РНК-мишенью зонда **MB1**, 5'-биспиренильная группа в котором находится в непосредственной близости к дуплексу, или зонда **MB4**, в котором расстояние от 5'-биспиренильной группировки до дуплекса составляло 3 нт, приводило к значительному увеличению эксимерной флуоресценции пирена. Появление интенсивной эксимерной флуоресценции при связывании зонда **MB4** с РНК-мишенью (в отличие от зондов **MB2** и **MB3**, имеющих схожее строение), вероятно, связано с тем, что 5'-«свисающий» конец зонда **MB4** частично комплементарен мишени и при гибридизации происходит образование двух С·G-пар, в результате чего 5'-биспиренильная группировка, как и в случае зонда **MB1**, оказывается расположенной в непосредственной близости от

дуплекса. Квантовые выходы флуоресценции «молекулярных маяков» **MB1-MB4** находились в диапазоне 1.1-2.2 %, при этом квантовые выходы флуоресценции дуплексов этих зондов с РНК-мишенью составили 6.2-16.5 %. При этом квантовые выходы флуоресценции 5'-биспиренильных зондов **H1-H4** были в диапазоне 31.9-70.4 %, а их дуплексов с РНК-мишенью – 16.7-28.0%, что свидетельствует об эффективном тушении флуоресценции пирена тушителем ВНQ1.

Для демонстрации возможности использования предложенных в работе зондов для визуализации внутриклеточной 28S рРНК методом гибридизации *in situ* нами были выбраны «молекулярные маяки» с максимальным соотношением сигнал/шум **MB1** и **MB4** (Рис. 9). Визуализацию РНК осуществляли в клетках линии НЕК293 Phoenix (совместно с к.б.н. В.С. Фишманом, ИЦИГ СО РАН).

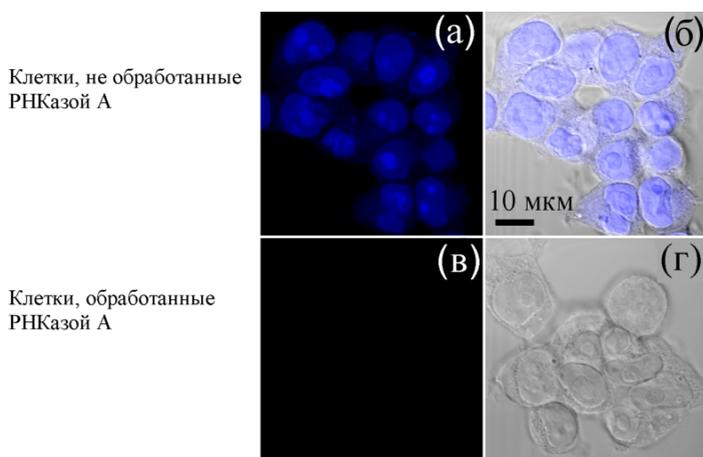


Рис. 9. Визуализация внутриклеточной 28S рРНК с использованием 5'-биспиренильного зонда типа «молекулярный маяк» **MB1** в фиксированных клетках линии НЕК293 Phoenix; (а) и (в) – канал флуоресценции пиренильного эксимера (λ_{exc} 405 нм, детекция флуоресценции в диапазоне длин волн 450-495 нм), (б) и (г) – объединенный канал (канал эксимерной флуоресценции + фазовый контраст).

При регистрации флуоресцентного отклика мы наблюдали интенсивное испускание эксимерной флуоресценции пирена на длинах волн 450-495 нм в ядрышках и цитоплазме (Рис. 9а,б), что подтверждает возможность визуализации 28S рРНК в фиксированных клетках с использованием разрабатываемых зондов.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования созданных в данной работе 5'-биспиренильных зондов типа «молекулярный маяк» на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) в качестве высокоселективных инструментов детекции внутриклеточной РНК.

Созданные зонды, а также выявленные закономерности возникновения эксимерной флуоресценции при гибридизации зондов с РНК могут быть использованы при разработке эффективных инструментов для детекции и визуализации других РНК-мишеней, а также могут стать основой для разработки новых высокочувствительных биосенсоров.

ВЫВОДЫ

В данной работе для флуоресцентной детекции РНК нами были созданы три варианта конструкций новых сиквенс-специфичных высокочувствительных эксимер-образующих зондов на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов).

1. Созданы новые линейные эксимер-образующие флуоресцентные зонды на основе устойчивых в биологических средах конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с одиночными и множественными (до трех) 2'-биспиренильными группировками и 3'-концевым «инвертированным» тимидином, комплементарных мРНК гена *mdr1*. Показано, что наличие динуклеотидов СС, СG или UC с 3'-стороны от 2'-модифицированного нуклеотида оказывает положительное влияние на интенсивность эксимерной флуоресценции комплексов зондов с РНК-мишенью. Продемонстрирована возможность детекции протяженной РНК с использованием созданных линейных 2'-биспиренильных зондов.

2. Получены новые эксимер-образующие тандемные зонды, содержащие два монопиренильных остатка на стыке компонентов, введенных на 5'-конец одного и на 3'-конец другого компонента посредством линкеров различного строения, обладающие высоким сродством и специфичностью к комплементарной РНК-мишени. Выяснено, что наиболее важным параметром в дизайне таких зондов является длина линкера, посредством которого введен пиренильный остаток на 3'-конец компонента зонда; для эффективного образования эксимера необходим линкер минимальной длины. Этот вывод подтвержден результатами расчетов, полученными с использованием методов молекулярной динамики.

3. Созданы новые зонды типа «молекулярный маяк», содержащие 5'-биспиренильную группу и тушитель флуоресценции ВNQ1 на 3'-конце. Показано, что наибольшей чувствительностью обладают зонды, при гибридизации которых с РНК-мишенью 5'-биспиренильная группировка располагается в непосредственной близости от дуплекса, а не на «свисающем» конце.

4. Продемонстрирована возможность визуализации 28S рРНК в клетках с использованием созданных тандемных зондов и зондов типа «молекулярный маяк».

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **Крашенинина О. А.**, Новопашина Д. С., Веньямина А. Г. Олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) со вставками 2'-биспиренилметилфосфодиамидных производных нуклеозидов как перспективные флуоресцентные зонды для детекции РНК // Биоорган. химия –2011. –Т. 37. –N. 2. –С. 273-277.
2. Boutorine A. S., Novopashina D. S., **Krasheninina O. A.**, Nozeret K., Venyaminova A. G. Fluorescent probes for nucleic acid visualization in fixed and live cells // *Molecules* –2013. –V. 18. –N. 12. –P. 15357-15397 (обзор).
3. **Krasheninina O. A.**, Novopashina D. S., Lomzov A. A., Venyaminova A. G. 2'-Bispyrene-modified 2'-*O*-methyl RNA probes as useful tools for the detection of RNA: synthesis, fluorescent properties, and duplex stability // *ChemBioChem* – 2014. –V. 15. –N. 13. – P. 1939-1946.
4. **Krasheninina O. A.**, Lomzov A. A., Fishman V. S., Novopashina D. S., Venyaminova A. G. Rational design and studies of excimer forming novel dual probes to target RNA // *Bioorg. Med. Chem.* –2017. –V. 25. –N. 7. –P. 2244-2250.
5. **Крашенинина О. А.**, Фишман В. С., Новопашина Д. С., Веньямина А. Г. 5'-Биспиренильные зонды типа «молекулярный маяк» для детекции РНК // Биоорган. химия –2017. –Т. 43. –N. 3. –С. 261-272.