

На правах рукописи



Дюдеева Евгения Сергеевна

**Исследование свойств частично или полностью
незаряженных фосфорилгуанидиновых аналогов
олигодезоксирибонуклеотидов как зондов для анализа
нуклеиновых кислот**

Специальность 1.4.9 —
«Химические науки. Биоорганическая химия.»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск — 2022

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Научный руководитель: **Пышная Инна Алексеевна**,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН

Официальные оппоненты: **Анненков Вадим Владимирович**,
доктор химических наук, профессор,
зав. лабораторией биомолекулярных систем
Лимнологического института СО РАН,
зам. директора ЛИИ СО РАН по науке

Завьялова Елена Геннадиевна,
доктор химических наук, доцент кафедры
химии природных соединений химического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Белоусова Екатерина Анатольевна,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
биоорганической химии ферментов
ИХБФМ СО РАН

Защита состоится **DD mmmmmmmm YYYU г. в XX часов** на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разслан **DD mmmmmmmm**2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ИХБФМ.02.01,
к.х.н.

Коваль В.В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. На сегодняшний день множество научно-исследовательских и прикладных задач задействуют олигонуклеотиды (ОН) – короткие синтетические нуклеиновые кислоты (НК). Современные подходы к синтезу позволяют вводить различные функциональные заместители в структуру ОН, за счёт чего возможно направленно влиять на физико-химические, структурные и субстратные свойства получаемых аналогов НК. Следует заметить, что синтез производных ОН, содержащих сразу несколько различных модификаций, часто является нетривиальной задачей, поскольку условия введения некоторых модификаций могут быть несовместимы либо между собой, либо в целом с условиями автоматического фосфитамидного синтеза – наиболее распространённого метода химического синтеза нуклеотидных цепей. Ярким примером являются пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) – синтетический аналог НК, в которых отрицательно заряженный углеводо-фосфатный остов заменён на электронейтральный. Поскольку синтез такого модифицированного остова задействует растворители и активаторы, принципиально отличающиеся от таковых в фосфитамидном методе синтеза ОН, получение химерных последовательностей – содержащих одновременно и ПНК звенья, и природные нуклеотидные звенья, – становится технически сложным.

Фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды (ФГО) также являются незаряженным аналогом НК, однако их синтез возможно провести в рамках стандартного фосфитамидного метода синтеза ОН. Это позволяет комбинировать фосфорилгуанидиновую (ФГ) модификацию со множеством других вариантов функционализации ОН, создавая различные химерные структуры с уникальными свойствами, подходящими для решения конкретной задачи. Получение таких функциональных производных ОН, исследование особенностей их очистки, выделения, описание их физико-химических и субстратных свойств является важной задачей в контексте современного и эффективного производства молекулярно-биологического инструментария на основе нуклеиновых кислот – например, высокоспецифичных праймеров, адаптеров, зондов, используемых при разработке систем ПЦР-диагностики и для развития методов высокопроизводительного секвенирования нового поколения.

Цель данной работы – системное изучение свойств частично или полностью незаряженных фосфорилгуанидиновых производных олигодезоксирибонуклеотидов, в том числе их субстратных свойств в реакции обратной транскрипции.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. физико-химическая характеристика ФГО, отличающихся числом и взаимным расположением ФГ групп;

2. изучение особенностей получения и/или очистки ФГО, содержащих функциональную нуклеотидную вставку на 3'-конце нуклеотидной последовательности;
3. исследование субстратных свойств ФГО как праймеров в реакции обратной транскрипции;
4. изучение возможности гомо- и гетерофазного обнаружения НК мишени с помощью ФГО-зондов, в том числе особенностей ковалентной иммобилизации ФГО на поверхность полимерных частиц.

Научная новизна данной работы состоит в исследовании нового класса незаряженных аналогов олигонуклеотидов – фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, предложенных в ИХБФМ СО РАН в 2014 году. Впервые описаны особенности получения и характеристики фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, в том числе:

1. предложен подход к электрофоретическому анализу электронных ОН в присутствии додецилсульфата натрия;
2. обнаружена проблема деградации ФГ группы в случае реализации анхимерного эффекта;
3. продемонстрирована способность как частично, так и полностью незаряженных ФГО выступать в качестве праймеров в реакции обратной транскрипции;
4. предложен способ ковалентной иммобилизации ФГО, содержащих 5'-концевую аминогруппу, на поверхность ВгСN-активированной сефарозы.

Теоретическая значимость состоит в выявлении особенностей характеристики ФГО с помощью стандартных методов обращённо-фазовой хроматографии (ОФХ), гель-электрофореза, спектрофотометрии и масс-спектрометрии. В работе описан феномен деградации ФГ звена вблизи 3'-концевой нуклеотидной вставки, содержащей замещённый этиленгликолевый фрагмент в составе линкера, и предложен возможный механизм деградации, основанный на анхимерном содействии гидроксигруппы. Впервые показана принципиальная возможность использования незаряженных ФГ олигонуклеотидов в качестве праймеров в реакции обратной транскрипции.

Полученные экспериментальные данные о физико-химических и субстратных свойствах ФГ олигонуклеотидов обладают **практической значимостью** в контексте создания новых высокоэффективных зондов и праймеров на основе синтетических аналогов НК: способность ФГО образовывать комплексы с комплементарной НК-мишенью в среде с низкой ионной силой может позволить провести анализ НК, обладающей сложной внутренней структурой, – например, различных клеточных РНК. Способность же ФГ олигонуклеотидов выступать субстратом для НК-процессирующего фермента – обратной транскриптазы – делает ФГО

потенциальной платформой для создания, в частности, праймеров-адаптеров, необходимых в процессе ОТ-ПЦР – первом этапе создания кДНК библиотек в рамках РНК-секвенирования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. введение нескольких ФГ групп увеличивает гидрофобность ФГО, что приводит к симбатному увеличению времени удерживания ФГО на обращённой фазе;
2. наличие ФГ групп уменьшает «удельный» отрицательный заряд рибозофосфатного остова, что приводит к уменьшению электрофоретической подвижности в денатурирующем ПААГ и ограничению множества молекулярных ионов, детектируемых методом масс-спектрометрии в режиме детекции полианионов;
3. увеличение числа ФГ групп в составе олигонуклеотида приводит к увеличению интенсивности оптического поглощения в диапазоне длин волн 200-240 нм, но не искажает профиль спектра поглощения вблизи 260 нм;
4. ФГО образуют комплементарные комплексы с ДНК-матрицами в водных растворах с низкой ионной силой; стабильность комплементарных ДНК-дуплексов, содержащих полностью незаряженный ФГО, практически не зависит от наличия катионов в растворе;
5. ФГ группа нестабильна в условиях аммонолиза при наличии прилегающей гидроксигруппы, способной участвовать в реализации анхимерного эффекта;
6. ФГО, в отличие от других известных незаряженных аналогов НК, могут выступать в качестве субстрата для РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони;
7. ФГО могут быть иммобилизованы на поверхность полимерных носителей (частиц полистирола или ВгСN-активированной сефарозы); для анализа комплементарных НК-мишеней в деионизованной воде необходимо подобрать полимерный носитель, не содержащий ионогенных групп.

Личный вклад. Основная часть работы была выполнена автором самостоятельно, в частности, синтез всех рассматриваемых нативных и ФГ олигодезоксирибонуклеотидов, их очистка и характеристика методами ОФХ, гель-электрофореза, проведение реакций обратной транскрипции и анализ полученных результатов. Эксперименты по электрофоретическому анализу электронеутральных ФГО в присутствии додецилсульфата натрия выполнены совместно с Павловой А.С. (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН). Эксперименты по термической денатурации ДНК комплексов были выполнены к.ф.-м.н. Ломзовым А.А. (ЛСтБ ИХБФМ СО РАН). Регистрацию масс-спектров проводили сотрудники ЦКП ИХБФМ СО РАН; синтез олигорибонуклеотидов – к.х.н. Мещанинова М.И. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН) и к.х.н. Довыденко И.С. (ЛСБ ИХБФМ СО РАН). Фрагмент 18S рРНК

человека любезно предоставлен д.х.н. Малыгиным А.А. (ЛСФР ИХБФМ СО РАН).

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 7 печатных изданиях, 4 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАКИ индексируемых Web of Science и Scopus, 3 — в тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения и выводов. Полный объем диссертации составляет 144 страницы, включая 62 рисунка и 13 таблиц. Список литературы содержит 124 наименования.

Содержание работы

Основным предметом изучения в данной работе являются фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды – олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие модифицированные фосфатные группы, в которых по атому фосфора введен остаток N,N,N',N'-замещенного гуанидина (рис. 1, «DMI»). Здесь и далее незаряженная ФГ-группа обозначена символом «*», а нативный фосфат – «^o» (рис. 1).

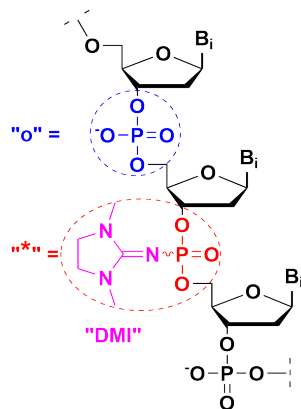


Рис. 1 — Структуры нативного фосфата («^o») и ФГ-группы («*»), содержащей остаток «DMI».

В данной работе проведено исследование:

- влияния ФГ-групп на физико-химические свойства ОН на примере ФГ-содержащих декануклеотидов и гомотимидилатных последовательностей;
- особенностей синтеза функциональных конструкций на основе ФГО на примере 3'-биотинилированных ОН;
- субстратных свойств ФГО в реакции обратной транскрипции на примере ФГ-содержащих декануклеотидов и флуоресцентно меченых ОН;
- возможности ковалентной иммобилизации ФГО на поверхности BrCN-активированной сефарозы и полистирольные частицы.

1 Влияние ФГ-групп на физико-химические свойства ОН

Для исследования влияния ФГ-групп на физико-химические свойства ОН была сконструирована модельная система из десяти ОН, нуклеотидная последовательность которых одинакова, но различно количество модифицированных фосфатных групп и их взаимное расположение (табл. 1).

Таблица 1 — Структуры исследуемых ФГ-декануклеотидов.

| Обозначение | Последовательность, 5'-3' | n^1 | μ^2 | t^3 , мин. |
|--------------------------|------------------------------|-------|---------|--------------|
| X | G° C° G° C° C° A° A° A° C° A | 0 | 0.93 | 5.60 |
| X _{1;4;7} | G* C° G° C* C° A° A* A° C° A | 3 | 0.69 | 6.37 |
| X _{1;5;9} | G* C° G° C° C* A° A° A° C* A | 3 | 0.69 | — |
| X _{2;4;5;8} | G° C* G° C* C° A* A° A* C° A | 4 | 0.60 | — |
| X _{1-2;5-6;9} | G* C* G° C° C* A* A° A° C* A | 5 | 0.48 | 7.00 |
| X _{1-2;5;8-9} | G* C* G° C° C* A° A° A* C* A | 5 | 0.48 | 7.05 |
| X _{1;3;5;7;9} | G* C° G* C° C* A° A* A° C* A | 5 | 0.48 | — |
| X _{1-3;7-9} | G* C* G* C° C° A° A* A* C* A | 6 | 0.36 | 7.47 |
| X _{2-3;5-6;8-9} | G° C* G* C° C* A* A° A* C* A | 6 | 0.36 | — |
| X ₁₋₉ | G* C* G* C* C* A* A* A* C* A | 9 | ~0 | 7.93 |

¹ Число ФГ-групп в декануклеотиде

² Электрофоретическая подвижность ОН в 15% денат. ПААГ относительно лидирующего красителя – бромфенолового синего.

³ Время удерживания ОН на обращённой фазе в линейном градиенте ацетонитрила (0-55% за 15 мин.).

ОН анализировали методами аналитической ОФХ, денатурирующего гель-электрофореза, спектрофотометрии, термической денатурации и масс-спектрометрии.

Хроматографический и электрофоретический анализ ФГО

Показано, что с ростом числа ФГ-групп увеличивается время удерживания олигонуклеотидов на неподвижной фазе C18 (рис. 2, табл. 1, t). Это свидетельствует о том, что ФГО обладают большей гидрофобностью по сравнению с немодифицированным аналогом. Очевидной причиной данному факту является частичная или полная потеря отрицательного заряда остова и появление в его составе N,N,N',N'-алкилзамещенных остатков гуанидина. Повышенная липофильность ФГО является немаловажным свойством, поскольку гидрофобные взаимодействия – это один из наиболее распространённых типов биомолекулярных взаимодействий, во многом определяющий широту использования, в частности, фосфотиоатных производных в биомедицинских приложениях.

Не исключено, что ФГО (особенно с более длинной нуклеотидной цепью) могут вступать в гидрофобные взаимодействия как между собой, так и с другими биополимерами, образуя различные надмолекулярные структуры. В зависимости от задачи исследования, это может быть как достоинством ФГО, так и недостатком, однако в любом случае данный эффект следует учитывать при дизайне таких аналогов НК.

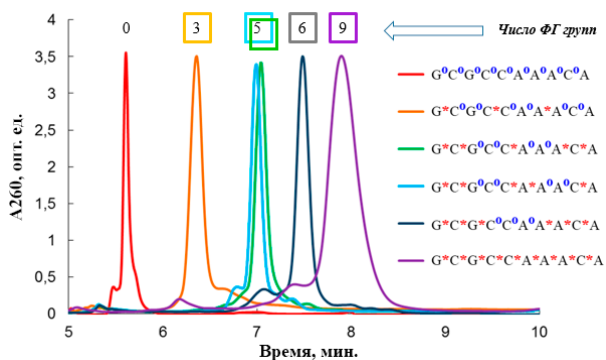


Рис. 2 — Профили ОФХ нативного и ФГ-декануклеотидов.

Снижение эффективного заряда при введении ФГ-групп в структуру ON также закономерно приводит к падению его электрофоретической подвижности в условиях стандартного денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле (табл. 1, μ). В пределе, когда остов ON полностью электронейтрален, ФГО полностью теряет способность мигрировать в геле. Также декануклеотиды, содержащие не менее 4 ФГ-групп, значительно хуже проявляются при помощи реактива «StainsAll» (данные не приведены). По-видимому, снижение заряда приводит к снижению эффективности взаимодействия «нуклеиновая кислота – краситель». Таким образом, для электронейтральных ФГО требуются специальные подходы к электрофоретическому разделению и визуализации олигонуклеотидного материала.

Электрофорез незаряженных ФГ-олиготимидилатов

Возможным подходом к электрофоретическому разделению незаряженных аналогов ON может быть гель-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), по аналогии с известной методикой Лэммли. Поэтому для проведения электрофоретического анализа заведомо электронейтральных ФГ-олиготимидилатов T_6^* , T_{10}^* , T_{15}^* , T_{20}^* , T_{26}^* использовали ПААГ и буферные растворы, содержащие SDS (0.05 или 0.1%). Результаты электрофореза визуализировали, помещая гель на флуорофор-содержащую подложку и облучая УФ-светом: олигонуклеотидный материал поглощает в области 260 нм и проявляется в виде «теней» на фоне флуоресцирующей подложки (рис. 3).

Видно, что ФГ-олиготимидилаты в присутствии SDS приобретают способность мигрировать в ПААГ. Диффузность и скорость миграции ON сильно зависит от концентрации SDS, а также от наличия хаотропного агента: в присутствии 5 М мочевины олиготимидилаты различной длины обладают практически одинаковой э/ф подвижностью. Предположительно, при образовании комплекса «SDS–ON» происходит одновременно

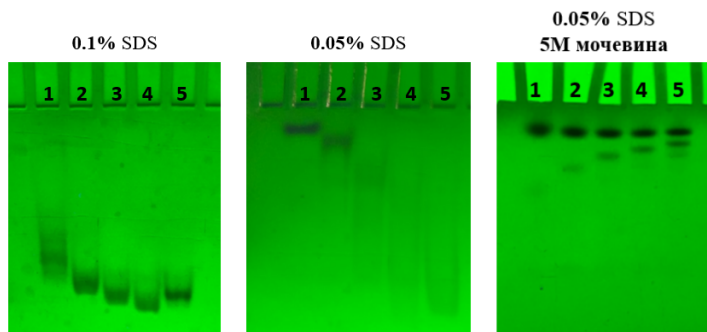


Рис. 3 — Электрофорез в 15% ПААГ незаряженных T_6^* (дор. 1), T_{10}^* (дор. 2), T_{15}^* (дор. 3), T_{20}^* (дор. 4), T_{26}^* (дор. 5) в присутствии SDS.

значимое увеличение и заряда, и эффективного размера аналита, что оказывает взаимно компенсирующее влияние на электрофоретическую подвижность ФГО, независимо от его длины. Важно отметить, что каждая дорожка геля содержит основную и побочную полосы, расстояние между которыми уменьшается при переходе к более протяженным ОН. Весьма вероятно, что побочные полосы соответствуют побочным продуктам синтеза, в которых содержатся заряженные фосфодиэфирные группы.

Таким образом, проведение электрофоретического анализа ФГО в присутствии и SDS, и мочевины позволяет оценить «чистоту» полученных электронейтральных ОН именно с точки зрения зарядового состояния. Можно предположить, что данный подход (в сочетании с другими методами анализа незаряженных олигомеров) в будущем позволит надёжно контролировать гомогенность синтезируемых электронейтральных ФГО. Электрофоретический анализ индивидуальных незаряженных ФГО проведён в данной работе впервые.

Масс-спектрометрический и спектрофотометрический анализ ФГО

Анализ частично незаряженных декануклеотидов проводили методом электроспрей-ионизации (ESI MS). Показано, что увеличение числа незаряженных фосфатных групп при фиксированной протяженности ОН накладывает ограничение на число возможных детектируемых заряженных форм (данные не приведены). Так, например, декануклеотид $G^*C^*G^*C^{\circ}C^{\circ}A^{\circ}A^{\circ}A^*C^*A$, содержащий шесть остатков ДМТ, не может обладать большим отрицательным зарядом, чем «3-». Как следствие, возникает ограничение на возможные величины m/z , которые могут быть зарегистрированы масс-спектрометром. В пределе, когда все фосфатные

группы «теряют» свой заряд, олигонуклеотид вообще не может быть обнаружен в режиме детекции отрицательно заряженных ионов. В связи с этим масс-спектрометрический анализ олигомера G^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}A^{*}A^{*}A^{*}C^{*}A^{*} проводили, добавив в образец раствор муравьиной кислоты (20 мМ). Это позволило детектировать ОН в виде положительно заряженного иона (данные не приведены).

Нативные ОН характеризуются специфическим профилем спектра поглощения в УФ-диапазоне спектра, в связи с чем спектрофотометрический анализ необходим для количественной оценки концентрации синтезированных ОН и, в то же время, является важной стадией контроля их качества.

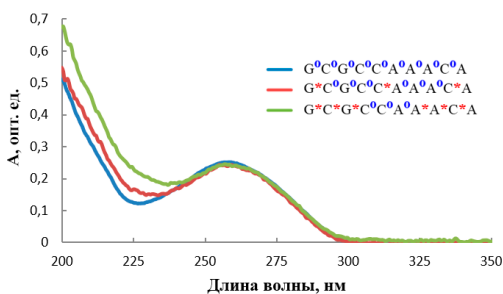


Рис. 4 — Профили спектров поглощения нативного и ФГ-декануклеотидов.

Данную особенность необходимо учитывать при работе с ФГО, так как повышенная интенсивность поглощения в области от 200 до 240 нм может быть ошибочно отнесена к наличию в препарате избытка солей различной природы, например, таких как фосфаты, ацетаты или широко используемых в молекулярной биологии буферных компонент (Tris или EDTA).

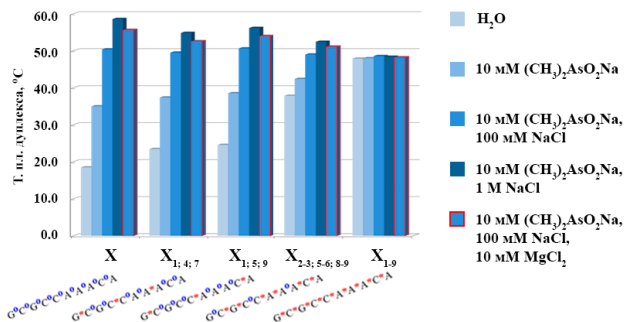
Исследование гибридизационных свойств ФГО

На следующем этапе работы методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала была исследована термическая стабильность ДНК/ДНК-комплексов, образованных представленными в таблице 1 ФГО и комплементарным нативным декануклеотидом 5'-TGTTTGGCGC-3'.

Исследование термической стабильности ДНК/ДНК комплексов проводили в растворах с различным солевым составом, параметры ионной силы растворов варьировали в широких пределах. Видно (рис. 5), что введение ФГ-групп стабилизирует комплементарные комплексы в условиях низкой ионной силы (менее 10 мМ). В то же время, в условиях

При сравнении спектров оптического поглощения нативного и модифицированных ОН (рис. 4) видно, что олигонуклеотиды, содержащие ФГ-группы, интенсивнее поглощают в диапазоне длин волн от 200 до 240 нм, остальная часть спектра при этом практически не искажается. Таким образом, ФГО характеризуются более низким значением A_{260}/A_{230} по сравнению с нативным аналогом.

Рис. 5 —
Стабильность ДНК-
комплексов, обра-
зованных ФГО, в
различных солевых
условиях.



умеренной ионной силы ($[Na^+] = 110$ mM) стабилизирующий эффект ФГ-групп практически исчезает. При высоком содержании ионов в растворе ($[Na^+] = 1$ M) наличие ФГ-групп умеренно дестабилизирует дуплекс, что, вероятно, связано с нарушением сольватации комплементарного комплекса при введении объёмных гидрофобных заместителей в его структуру.

Одним из наиболее значимых результатов данной части работы является тот факт, что в случае полностью незаряженного X_{1-9} термостабильность ДНК-дуплекса перестает зависеть от концентрации катионов в растворе. Способность незаряженных ФГО образовывать комплементарные комплексы даже в деионизованной воде может позволить эффективно связывать НК-мишени, обладающие сложной внутренней структурой, за счёт её дестабилизации при дефиците катионов в растворе. Таким образом, ФГО могут быть перспективной платформой для создания высокоэффективных зондов для анализа НК.

2 Синтез ФГО, содержащих 3'-концевую нуклеотидную вставку

В качестве примера функционального производного на основе ФГ-ДНК были синтезированы 26-звенные ON, содержащие на 3'-конце нуклеотидную биотиновую вставку. Остаток биотина является важным функциональным заместителем, часто используемым, например, для иммобилизации биомолекул на поверхности при разработке биосенсоров или систем для выделения НК.

Было обнаружено, что выход целевого продукта синтеза ФГО, в составе которого присутствует 3'-концевая нуклеотидная вставка (рис. 6), значительно ниже такового для нативного ON. Для выяснения причин деградации целевого продукта была проведена характеристика выделенных производных ON методом масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией (ESI MS) и предложенного ранее SDS-электрофореза в присутствии 5 M мочевины.

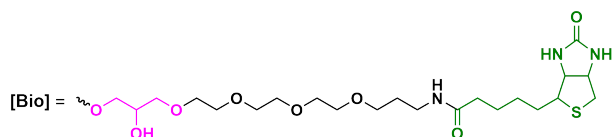


Рис. 6 — Структура 3'-концевой вставки, содержащий остаток биотина

Согласно полученным масс-спектрам, продукт синтеза целевого биотинилированного ФГО N26* представляет собой смесь продуктов деградации, в которых утеряна либо хотя бы одна ФГ-группа, либо всё нуклеотидное звено в целом (данные не представлены). Дополнительно был проанализирован частично незаряженный ФГО N25*1°, в котором вблизи нуклеотидной вставки находится одна нативная фосфодиэфирная группа, и в его масс-спектре не было обнаружено пиков, указывающих на деградацию ON. Также N25*1° характеризуется большей гомогенностью согласно результатам гель-электрофореза в присутствии SDS (рис. 7).

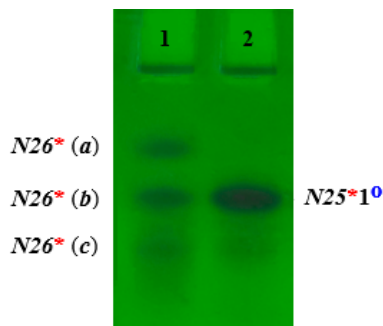


Рис. 7 — SDS-электрофорез биотиновых ФГО N26* (дор. 1) и N25*1° (дор. 2).

Таким образом, видно, что при наличии ФГ-группы в 3'-концевой позиции, вблизи нуклеотидного звена, N26* деградирует с образованием трёх продуктов в сравнимых количествах. Принимая во внимание этот факт, а также химическую структуру терминального нуклеотидного звена (рис. 7), можно предположить, что, вероятно, реализуется «анхимерное содействие», согласно которому деструкция ФГ-группы ускоряется соседней гидроксигруппой линкера на основе замещенного этиленгликолевого остатка, входящего в состав нуклеотидного звена.

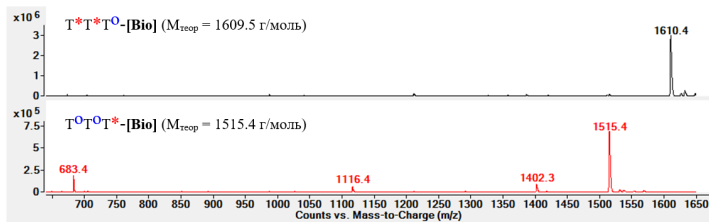
Модель деструкции 3'-функционализированных производных ФГО

Для проверки гипотезы об анхимерном содействии были синтезированы модельные тритимидилаты, содержащие 3'-концевое нуклеотидное звено и остатки ДМІ в различных позициях: $T^*T^*T^{\circ}-[Bio]$ и $T^{\circ}T^{\circ}T^*-[Bio]$. Данные тринуклеотиды после синтеза были обработаны концентрированным раствором аммиака (2 ч, 56 °C), и каждая реакционная смесь (без предварительного разделения компонентов) была проанализирована методом масс-спектрометрии.

В случае, когда остатки ДМІ находятся только между нуклеотидными звеньями (рис. 8, сверху), в профиле масс-спектра наблюдали сигнал,

соответствующий полноразмерному продукту синтеза $T^*T^*T^{\circ}-[Bio]$. Других значений m/z , свидетельствующих о деградации целевого продукта, в спектре не наблюдали.

Рис. 8 —
Масс-спектры
 $T^*T^*T^{\circ}-[Bio]$
(сверху) и
 $T^{\circ}T^{\circ}T^*-[Bio]$
(снизу).



Во втором случае, когда ФГ-группа находится на 3'-конце рядом с нуклеотидной вставкой, в полученном масс-спектре присутствует как сигнал, соответствующий целевому продукту $T^{\circ}T^{\circ}T^*-[Bio]$ ($m/z = 1515.4$, $z = 1$ -), так и другие – с меньшими значениями m/z (рис. 8, снизу). Ни один из них не является второй зарядовой формой целевого продукта с $z = 2$ -, поскольку в этом случае отношение m/z имело бы значение около 756.7. Следовательно, другие сигналы также соответствуют зарядовому числу $z = 1$ -, но с меньшей молекулярной массой, то есть снова наблюдается деградация целевого продукта.

Предположительно, в составе ФГ-группы алкилзамещённый гуанидиновый фрагмент может выступать в роли донора электронов по мезомерному эффекту, стабилизируя положительный заряд, возникающий на атоме фосфора в результате поляризации двойной связи $P=O$. Таким образом, возможно, в составе ФГ-группы двойная связь $P=O$ ионизована в большей степени, нежели в случае немодифицированной фосфатной группы. В случае непосредственной близости ФГ-группы и рассматриваемого нуклеотидного звена, может реализоваться внутримолекулярная атака свободной гидроксигруппы, входящей в состав линкера, по атому фосфора. Это может привести к образованию циклического эфира фосфорной кислоты, который в дальнейшем может деградировать с расщеплением одной из связей $P-O$ или $P-N$, что и привело бы к разрушению ФГ-группы, либо утере нуклеотидного звена.

Согласно данной гипотезе, тринуклеотид $T^{\circ}T^{\circ}T^*-[Bio]$ мог бы образовать циклический эфир фосфорной кислоты. В процессе обработки концентрированным водным раствором аммиака возможен разрыв одной из связей $P-O$ или $P-N$. На рисунке 9 приведены возможные продукты деградации в зависимости от того, какая связь была разорвана (пути А, В, С, D) и указаны теоретические молекулярные массы биотин-содержащих продуктов распада. Весьма вероятно, что образующиеся по пути С или D

циклические триэфир **III** и фосфорилгуанидин **IV** могут быть также гидролизованы с образованием ациклических форм, что следует учитывать при анализе масс-спектров.

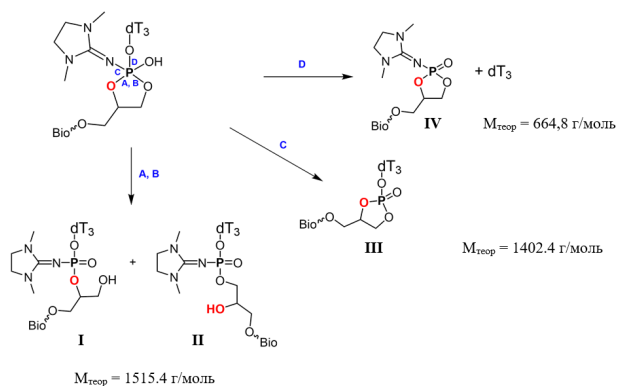


Рис. 9 — Схема деструкции циклического эфира фосфорной кислоты с разрывом одной из связей А, В, С, D. На рисунке приведены теоретические молекулярные массы биотинсодержащих продуктов **I-IV**.

Значения m/z , обнаруженные в масс-спектре продуктов синтеза биотинилированных ФГ-тригмидилатов (рис. 8) не противоречат предложенной схеме деструкции модифицированных ON. Таким образом, исходя из результатов масс-спектрометрического анализа продуктов синтеза $T^*T^*T^{\circ}\text{-[Bio]}$ и $T^{\circ}T^{\circ}T^*\text{-[Bio]}$, можно утверждать, что непосредственная близость ФГ-группы и нуклеотидного звена, содержащего свободную гидроксигруппу в составе этиленгликолевого линкера, приводит к деструкции целевого продукта синтеза $T^{\circ}T^{\circ}T^*\text{-[Bio]}$. Данный факт накладывает ограничение на множество химических структур, в состав которых возможно ввести ФГ-группы: непосредственная близость ФГ-группы и заместителей, обладающих нуклеофильными свойствами, может привести к деградации целевого продукта, что необходимо учитывать при дизайне функционализированных ON, содержащих ФГ-фрагменты остова.

3 Исследование субстратных свойств ФГО в реакции обратной транскрипции (ОТ)

Чтобы установить возможность использования ФГО как праймеров в реакции ОТ, был сконструирован ДНК/РНК субстрат, состоящий из декануклеотидных ДНК-праймеров, представленных в таблице 1, и 18-звенной РНК-матрицы гМ (рис. 10).

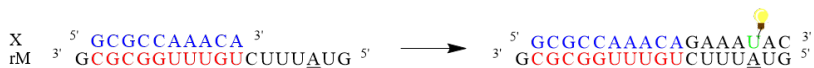


Рис. 10 — Схема удлинения декануклеотида серии X в реакции ОТ.

Таблица 2 — Структуры праймеров для реакции ОТ с участием высокомолекулярной РНК-матрицы, фрагмента 18S рРНК человека. [Flu] — ненуклеотидная вставка, содержащая остаток флуоресцеина.

| | Последовательность, 5'-3' |
|------|---|
| J1.o | [Flu] ^o A ^o T ^o C ^o G ^o T ^o T ^o T ^o A ^o T ^o G ^o G ^o T ^o C ^o G ^o G ^o A ^o A ^o C ^o T ^o A |
| J1.6 | [Flu] ^o A [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] T [*] G [*] G [*] T [*] C [*] G [*] G [*] A [*] A [*] C [*] T [*] A |
| J1.3 | [Flu] ^o A [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] T [*] G [*] G [*] T [*] C [*] G [*] G [*] A [*] A [*] C [*] T [*] A |
| J1.x | [Flu] ^o A [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] T [*] G [*] G [*] T [*] C [*] G [*] G [*] A [*] A [*] C [*] T [*] A |
| J2.o | [Flu] ^o C ^o C ^o C ^o T ^o C ^o T ^o T ^o A ^o A ^o T ^o C ^o A ^o T ^o G ^o G ^o C ^o C ^o T ^o C ^o A ^o G ^o T |
| J2.6 | [Flu] ^o C [*] C [*] C [*] T [*] C [*] T [*] T [*] A [*] A [*] T [*] C [*] A [*] T [*] G [*] G [*] C [*] C [*] T [*] C [*] A [*] G [*] T |
| J2.3 | [Flu] ^o C [*] C [*] C [*] T [*] C [*] T [*] T [*] A [*] A [*] T [*] C [*] A [*] T [*] G [*] G [*] C [*] C [*] T [*] C [*] A [*] G [*] T |
| J2.x | [Flu] ^o C [*] C [*] C [*] T [*] C [*] T [*] T [*] A [*] A [*] T [*] C [*] A [*] T [*] G [*] G [*] C [*] C [*] T [*] C [*] A [*] G [*] T |

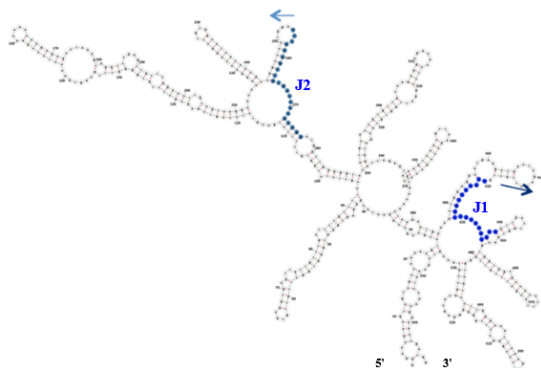


Рис. 12 — Возможная вторичная структура фрагмента 18S рРНК человека. J1 и J2 — сайты, выбранные для гибридизации праймеров. Стрелками указано направление удлинения праймеров.

5 мМ дитиотреит). Протяженные продукты реакции ОТ анализировали методом гель-электрофореза в 1.5% агарозном геле, детектируя продукты удлинения праймера по сигналу флуоресценции (рис. 13). Видно, что введение ФГ-групп в состав праймера приводит к ожидаемому понижению его электрофоретической подвижности за счёт уменьшения суммарного заряда молекулы (рис. 13, дор. 1, 4, 7, 10). Ферментативная элонгация праймера наблюдается во всех случаях, даже для праймеров, обладающих полностью электронейтральным углеводо-фосфатным остовом (рис. 13, дор. 11, 12).

Следует отметить, что электрофоретическая подвижность исходных ФГО-праймеров (рис. 13, дор. 4, 7, 10) ниже, чем у продуктов их удлинения в реакции ОТ (рис. 13, дор. 5-6, 8-9 и 11-12). По всей видимости, на начальных этапах реакции включение очередного dNTP в растущую цепь модифицированного ФГО-праймера влечёт за собой увеличение скорости миграции ОН в геле за счёт более заметного изменения заряда; размер молекулы при этом ещё не изменился настолько значительно, чтобы вызвать задержку в порах агарозного геля. Однако при достижении некой

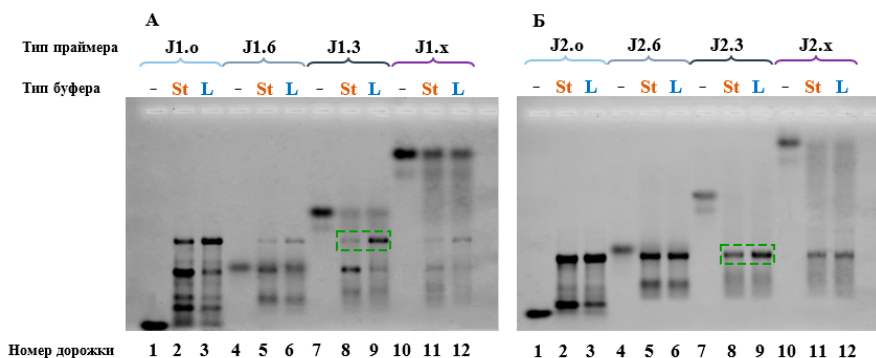


Рис. 13 — Сигнала флуоресценции после разделения в 1.5% агарозном геле продуктов реакции ОТ с участием ФГО-праймеров серии J1 (А) и J2 (Б). Тип праймера и буферного раствора указаны на рисунке.

критической длины на более поздних этапах реакции общий размер молекул оказывает большее влияние на скорость миграции в геле, нежели чем увеличение заряда при включении очередного dNMP. Таким образом, протяженные продукты реакции ОТ для ФГ-содержащих праймеров демонстрируют «классическое» поведение в геле, замедляясь при увеличении размера молекулы. Вклад относительно небольшого числа ФГ-групп в этом случае становится незначителен. Благодаря этому, вероятно, электрофоретическая подвижность наиболее представленных продуктов реакции ОТ практически не зависит от числа модификаций в исходном ФГО-праймере.

Понижение ионной силы реакционного буфера может способствовать накоплению более длинных продуктов элонгации ФГО-праймеров: например, в случае праймеров J1.3 и J2.3 (рис. 13, дор. 8-9). Для других ФГО изменение ионной силы практически не повлияло на распределение продуктов реакции ОТ. Также необходимо отметить, что наличие ФГ-групп в составе праймера в целом приводит к снижению эффективности реакции ОТ. Можно предположить, что отсутствие заряженных фосфодиэфирных групп дестабилизирует фермент-субстратный комплекс или нарушает его пространственную организацию на этапах инициации или транслокации. Также можно предположить, что не все стерические формы ФГ-праймеров, возникающие вследствие хиральности ФГ-групп, являются «подходящими» для образования каталитически активного фермент-субстратного комплекса.

Аналогичные эксперименты были проведены с использованием рекомбинантной обратной транскриптазы вируса HIV-1, однако накопление продуктов элонгации ДНК-праймеров было менее выраженным (данные не приведены). Для детального установления влияния ФГ-групп на протекание реакции ОТ с использованием каждого из рассмотренных ферментов

требуется множество дополнительных экспериментов, направленных на исследование термодинамических и кинетических параметров реакции ОТ, а также на установление пространственного расположения ФГ-групп в активном центре фермента и ключевых контактов ФГ-групп и аминокислотных остатков.

4 Имобилизация ФГО на поверхности

ОН, содержащие незаряженный остов, могут способствовать усилению связывания НК-мишеней за счёт дестабилизации их внутренней структуры. Таким образом, проведение гибридизации «зонд-мишень» в растворах с низкой ионной силой может быть подходом к усовершенствованию систем детекции и/или очистки различных клеточных НК. Как правило, такие системы подразумевают фиксацию ОН-зонда на поверхности, в связи с чем важно установить возможность иммобилизации ФГО на носитель и гибридизации ФГО-зонда с комплементарной мишенью в растворе с ультранизкой ионной силой. Для иммобилизации ФГО были рассмотрены два варианта поверхности, различные по своей природе:

- полимерный носитель для синтеза ОН на основе полистирола, содержащий амидную связь с первым (3'-концевым) нуклеотидным звеном. Данная амидная связь не гидролизует на этапе деблокирования ОН, таким образом, синтезированный зонд не переходит в раствор, оставаясь зафиксированным на частицах носителя;
- активированная BrCN-сефароза – полимерный носитель, используемый для ковалентной иммобилизации биомолекул, содержащих алифатическую аминогруппу (чаще всего, белки).

На первом этапе провели проверку неспецифической сорбции НК на поверхности частиц, не содержащих комплементарного зонда в принципе. Каждый из типов частиц инкубировали со смесью гетерополимерных ДНК 5'-GCGCCAAACA-3' и РНК 5'-г(GUAUUUCUGUUUGGCGCG)-3' либо в деионизованной воде, либо в стандартном буферном растворе для ОТ («St»). Супернатанты анализировали в 15% денат. ПААГ (рис. 14).

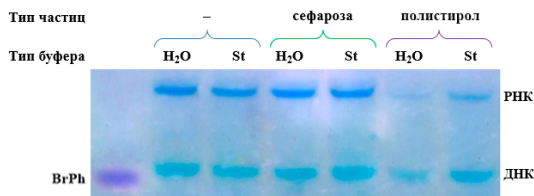


Рис. 14 — Результат э/ф анализа в 15% денат. ПААГ смеси ОН после инкубации с частицами, не содержащими зонда.

BrPh – бромфеноловый синий.

Видно, что неспецифическая сорбция НК наблюдается в случае полистирольных частиц (дор. 5-6), о чём свидетельствует утеря олигонуклеотидного материала по сравнению с контрольными растворами ОН, не контактировавшими с фазой (дор. 1-2). Предположительно, сорбция на

частицы полистирола происходит вследствие гидрофобных взаимодействий поверхности и ON. В свою очередь, состав супернатантов после инкубации с инактивированной сефарозой (дор. 3-4) идентичен контрольным растворам, следовательно, неконтролируемых взаимодействий данной поверхности и НК не происходит. Основываясь на этом результате, для иммобилизации ФГО-зондов использовали частицы сефарозы.

Для покрытия частиц BrCN активированной сефарозы олигонуклеотидными зондами были синтезированы и очищены нативные и ФГ-ДНК J1^o, J1^{*}, J2^o, J2^{*}, содержащие 5'-концевую нуклеотидную вставку, несущую аминогруппу. Также были синтезированы комплементарные ДНК-мишени MJ1 и MJ2, содержащие остаток флуоресцеина (табл. 3).

Таблица 3 — Структуры зондов для иммобилизации на частицы BrCN активированной сефарозы и комплементарных флуоресцентно-меченых НК-мишеней. [Flu] — нуклеотидная вставка, содержащая остаток флуоресцеина; [NH₂] — нуклеотидная вставка, содержащая алифатическую аминогруппу.

| | Последовательность, 5'-3' |
|-----------------|--|
| J1 ^o | [NH ₂] ^o A ^o T ^o C ^o G ^o T ^o T ^o T ^o A ^o T ^o G ^o G ^o T ^o C ^o G ^o G ^o A ^o A ^o C ^o T ^o A |
| J1 [*] | [NH ₂] ^o A [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] T [*] G [*] G [*] T [*] C [*] G [*] G [*] A [*] A [*] C [*] T [*] A |
| J2 ^o | [NH ₂] ^o C ^o C ^o C ^o T ^o C ^o T ^o T ^o A ^o A ^o T ^o C ^o A ^o T ^o G ^o G ^o C ^o C ^o T ^o C ^o A ^o G ^o T |
| J2 [*] | [NH ₂] ^o C [*] C [*] C [*] T [*] C [*] T [*] T [*] A [*] A [*] T [*] C [*] A [*] T [*] G [*] G [*] C [*] C [*] T [*] C [*] A [*] G [*] T |
| MJ1 | TAGTTCGGACCATAAACGAT-[Flu] |
| MJ2 | ACTGAGGCCATGATTAAGAGGG-[Flu] |

Зонды иммобилизовали, инкубируя раствор соответствующего ON с частицами сефарозы в 10 mM NaHCO₃, pH 8.0 в течение ночи при +4 °C и постоянном перемешивании. Затем проводили щелочной гидролиз непрореагировавших -OCN во избежание неспецифических взаимодействий с НК-мишенью. Фазу промывали над фильтром водой до нейтральной реакции среды, затем добавляли НК-мишени в деионизованной воде или буферном растворе. Гибридизацию проводили в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего супернатанты переносили, концентрировали и проводили электрофорез в 15% денатурирующем ПААГ (рис. 15).

Использование смеси мишеней позволяет дополнительно подтвердить специфичность гибридизации «зонд-мишень» для каждого из рассматриваемых зондов. Видно, что образование комплементарных комплексов происходит исключительно в буферном растворе вне зависимости от типа иммобилизованного зонда. Зависимость эффективности связывания НК-мишени от присутствия катионов в растворе даже в случае незаряженного зонда может свидетельствовать о наличии каких-либо ионогенных групп в составе частиц сефарозы.

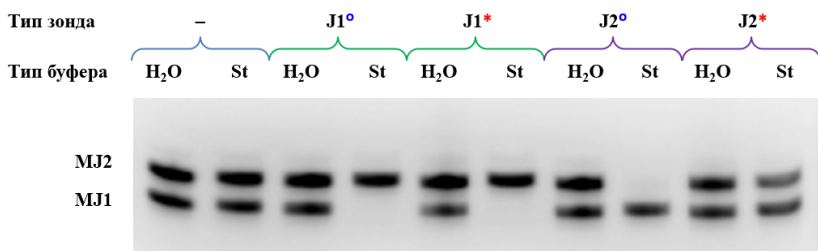


Рис. 15 — Результат э/ф анализа смеси ДНК-мишеней MJ1 и MJ2 после инкубации с индивидуальными зондами J1^o, J1^{*}, J2^o, J2^{*}, иммобилизованными на частицах сефарозы, в деионизованной воде и буферном растворе (St). Изображения получены в результате сканирования флуоресценции FAM.

Для проверки её «зарядового состояния» провели окрашивание фазы двумя вариантами красителя – отрицательно заряженным ксиленцианоловым синим и положительно заряженным метиленовым синим – в 20% этиловом спирте. Рассматривали отдельно частицы ВtCN активированной сефарозы, а также частицы агарозы, не подвергавшейся активации бромцианом (и, следовательно, не содержащей -OCN групп). Каждый тип частиц инкубировали с растворами красителей в течение 2 часов при комнатной температуре, затем регистрировали спектры оптического поглощения раствора над фазой и исходных растворов красителей. В случае частиц агарозы и инактивированной сефарозы наблюдали интенсивную сорбцию метиленового синего на поверхность частиц, что приводило к уменьшению интенсивности поглощения красителя в растворе (данные не приведены). Это может свидетельствовать о наличии отрицательного заряда на поверхности частиц сефарозы, препятствующем образованию комплекса «зонд-мишень». Таким образом, для того, чтобы стала возможной реализация преимуществ незаряженных ФГО как зондов для специфичного выхватывания высокоструктурированных НК, необходимо подобрать подходящий полимерный носитель, не обладающий, с одной стороны, какими-либо ионогенными группами, и не являющийся выраженно липофильным, с другой стороны.

Заключение

В данной работе описаны некоторые физико-химические свойства частично или полностью незаряженных ФГО, критичные для их синтеза, очистки и характеристики. Также исследована возможность использования ФГО как зондов для анализа НК, в частности, праймеров в реакции ОТ или зондов для деплеции НК.

Выводы

1. Изучено влияние числа и взаимного расположения фосфорилгуанидиновых (ФГ) групп в рибозофосфатном остове олигодезоксирибонуклеотидов (ОН) на их физико-химические свойства. Показано, что наличие нескольких ФГ-групп:
 - повышает гидрофобность ОН;
 - уменьшает суммарный отрицательный заряд ОН, что сказывается на электрофоретической подвижности ОН и влияет на профиль масс-спектра, полученного методом ESI MS в режиме детекции полианионов;
 - повышает интенсивность оптического поглощения ОН в диапазоне 200-240 нм.
2. Предложен подход к электрофоретическому анализу электронейтральных фосфорилгуанидиновых олигодезоксирибонуклеотидов (ФГО) в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.
3. Установлено, что введение ФГ-групп стабилизирует комплементарные ДНК-комплексы в растворах с пониженной ионной силой. Электронейтральные ФГО образуют стабильные дуплексы с нативной комплементарной цепью вне зависимости от ионной силы раствора, в том числе в деионизованной воде. Стабильность комплексов, содержащих частично незаряженные ФГО, зависит от взаимного расположения ФГ-групп и немодифицированных фосфатных групп: протяженные заряженные фрагменты остова в составе ФГО умеренно дестабилизируют дуплекс.
4. Показано, что при наличии нуклеофильных заместителей вблизи ФГ-звена возможна реализация анхимерного содействия, приводящего к деградации ФГ-группы в условиях аммонолиза.
5. Впервые продемонстрирована способность как частично, так и полностью незаряженных ФГО выступать в роли праймера-затравки в реакции обратной транскрипции, катализируемой РНК-зависимой ДНК-полимеразой, в том числе с участием протяженной структурированной РНК-матрицы (фрагмент 18S рРНК человека).
6. Продemonстрирована возможность ковалентной иммобилизации электронейтральных ФГО на поверхности частиц ВrCN-активированной сефарозы. Показана критическая значимость химической природы используемого полимерного носителя: наличие аниогенных групп в составе частиц препятствует взаимодействию ФГО-зонда с комплементарной НК-мишенью в отсутствие катионов в растворе.

Публикации автора по теме диссертации

1. *Pavlova A. S., Dyudeeva E. S., Kupryushkin M. S., Amirkhanov N. V., Pyshnyi D. V., Pyshnaya I. A.* SDS-PAGE procedure: Application for characterization of new entirely uncharged nucleic acids analogs // *Electrophoresis*. — 2018. — Vol. 39. — P. 670—674.
2. *Dyudeeva E., Kupryushkin M., Lomzov A., Pyshnaya I., Pyshnyi D.* Physicochemical properties of the phosphoryl guanidine oligodeoxyribonucleotide analogs // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. — 2019. — Vol. 45. — P. 709—718.
3. *Dyudeeva E., Pavlova A., Kupryushkin M., Pyshnyi D., Pyshnaya I.* Problems of the Synthesis of Oligonucleotide Derivatives in the Realization of the Anchimeric Effect // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. — 2021. — Vol. 47. — P. 505—513.
4. *Дюдеева Е., Пышная И.* Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды как праймеры для РНК-зависимого ДНК синтеза с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. — 2022. — Т. 26. — С. 5—13.
5. *Дюдеева Е. С., Павлова А. С.* // Сборник тезисов IV международной конференции молодых учёных биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2017. — 2017.
6. *Дюдеева Е. С., Павлова А. С.* // Сборник тезисов Зимней молодёжной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии 2018 г. — 2018.
7. *Дюдеева Е. С.* // Сборник тезисов VII международной конференции молодых учёных вирусологов, биотехнологов, молекулярных биологов и биофизиков OpenBio-2020. — 2020.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований №19-34-90132.

Дюдеева Евгения Сергеевна

«Исследование свойств частично или полностью незаряженных
фосфорилгуанидиновых аналогов олигодезоксирибонуклеотидов как зондов для
анализа нуклеиновых кислот»

Автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата химических наук

Подписано в печать _____.____._____. Заказ № _____

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж ___ экз.

Типография _____

