

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт химической биологии и фундаментальной медицины»
Сибирского Отделения Российской Академии Наук



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.»

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Кандидат химических наук
Пышная Инна Алексеевна

Новосибирск — 2022

Оглавление

	Стр.
Введение	4
1. Способы получения и свойства незаряженных аналогов олигонуклеотидов (обзор литературы)	9
1.1 Краткая история развития методов химического синтеза ДНК	10
1.1.1 Синтез и свойства электронейтральных аналогов нуклеиновых кислот	17
1.1.1.1 Типы электронейтральных аналогов олигонуклеотидов	17
1.1.1.2 Способы получения морфолиновых аналогов олигонуклеотидов	20
1.1.1.3 Способы получения пептидо-нуклеиновых кислот	26
1.1.1.4 Способы получения Р-алкилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов	30
1.1.1.5 Способы получения фосфорилгуанидиновых аналогов олигонуклеотидов	34
1.2 Возможности использования производных олигонуклеотидов для анализа нуклеиновых кислот	41
1.2.1 Использование модифицированных олигонуклеотидов для деплеции нуклеиновых кислот	42
1.2.2 Использование модифицированных олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции	46
2. Материалы и методы	54
2.1 Синтез олигонуклеотидов	54
2.2 Деблокирование олигонуклеотидов	54
2.3 Хроматография	55
2.4 Масс-спектрометрия	56
2.5 Спектрофотометрия	56
2.6 Термическая денатурация ДНК-дуплексов	56
2.7 Реакции обратной транскрипции	57
2.8 Гель-электрофорез	58
2.9 Иммуобилизация олигонуклеотидов на поверхности	59

3. Результаты и обсуждение	61
3.1 Влияние ФГ-групп на физико-химические свойства олигодезоксирибонуклеотидов	62
3.1.1 Хроматографический и электрофоретический анализ ФГО	64
3.1.2 Электрофоретический анализ незаряженных ФГ-олиготимидилатов	67
3.1.3 Масс-спектрометрический анализ ФГО	71
3.1.4 Спектрофотометрический анализ ФГО	73
3.1.5 Исследование гибридизационных свойств ФГО	75
3.2 Синтез ФГ-олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 3'-концевой остаток биотина	79
3.2.1 Модель деструкции 3'-функционализированных производных ФГО	83
3.3 Исследование субстратных свойств ФГ-олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции (ОТ)	90
3.3.1 Реакции ОТ с участием гомополимерного А/Т субстрата .	101
3.4 Иммуобилизация ФГО на поверхности	108
Заключение	118
Выводы	121
Список сокращений и условных обозначений	123
Словарь терминов	125
Список литературы	126
Список рисунков	140
Список таблиц	144

Введение

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. Так, повышенная стабильность ОН по отношению к нуклеазам достигается при введении фосфотиоатных [1], 2'-ОМе и 2'-F нуклеотидных звеньев [2]. Для повышения сродства олигонуклеотида к комплементарной НК-мишени используют различные модификации углеводо-фосфатного остова (например, «замкнутые» нуклеотидные звенья [3]). Наличие пептидо-нуклеиновых остатков [4], морфолиновых нуклеотидов [5] в составе ОН приводит к эффективной гибридизации с НК-мишенью в растворах с низкой ионной силой. Введение различных ненуклеотидных вставок в состав ОН – как внутри, так и на 5'- или 3'-конце нуклеотидной последовательности – позволяет направленно изменять гибридизационные свойства [6] и вводить функциональные группировки различной химической природы [7; 8]. К примеру, олигонуклеотиды, несущие остаток биотина, при разработке систем детекции НК широко используют для получения поверхностей биосенсоров, биочипов и т.д. 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 упомянутые выше пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) – синтетический аналог НК, в которых отрицательно заряженный углеводо-фосфатный остов заменён на электронейтральный линейный полиамид на основе N-(2-аминоэтил)глицина. 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), предложенные в 2014 году коллективом авторов [9; 10], также являются незаряженным аналогом НК, однако их синтез возможно провести в рамках 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.

Целью данной работы является 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 ненуклеотидную 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 электронейтральных олигонуклеотидов 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 BrCN-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.

Практическая значимость: 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 ФГ-производных 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 ФГ-олигонуклеотиды потенциальной платформой для создания, в частности, праймеров-адаптеров, необходимых в процессе ОТ-ПЦР – первом этапе создания кДНК библиотек в рамках РНК-секвенирования.

Методология и методы исследования: основные результаты работы получены с использованием методов ОФХ, спектрофотометрии,

масс-спектрологии, гель-электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле. Все олигодезоксирибонуклеотиды и их модифицированные аналоги были получены в рамках фосфитамидного протокола синтеза в автоматическом режиме.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. введение нескольких ФГ-групп увеличивает гидрофобность ФГО, что приводит к симбатному увеличению времени удерживания ФГО на об-ращённой 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 ВгSN-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 электронейтральных 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, задействованных в качестве РНК-матриц в реакциях обратной транскрипции, проводили: с.н.с. ЛХРНК, к.х.н. Мещанинова М.И. (26-зв. и 60-зв. РНК) и с.н.с., зав. ЛСБ, к.х.н. Довыденко И.С. (10-зв. РНК). 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 ВАК, 4 — в периодических научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, 3 — в тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и выводов. Полный объем диссертации составляет 144 страницы, включая 62 рисунка и 13 таблиц. Список литературы содержит 124 наименования.

1. Способы получения и свойства незаряженных аналогов олигонуклеотидов (*обзор литературы*)

Нуклеиновые кислоты – важнейший класс биомолекул, история исследования которых берёт начало в конце XIX века. Спустя несколько десятилетий, к середине XX века, были установлены химический состав, структура и биологическая функция нуклеиновых кислот как носителя генетической информации. Открытие класса молекул, имеющих такое большое биологическое значение, не могло не вызвать интерес к тому, чтобы освоить химический синтез нуклеиновых кислот. И действительно, уже в 1940-ых годах в Кембридже осуществляли первые попытки получить короткие нуклеотидные последовательности. На сегодняшний же день химический синтез олигонуклеотидов – относительно коротких последовательностей ДНК или РНК – является рутинной задачей, однако актуальным является поиск удобных способов создания модифицированных аналогов нуклеиновых кислот, наделённых заранее заданными функциональными свойствами.

Существует множество синтетических подходов, позволяющих вводить в структуру олигонуклеотида разнообразные ненуклеотидные вставки нужной химической природы (различные линкеры, заряженные группы, липофильные заместители, флуоресцентные метки и тому подобное) [11; 12]. Олигонуклеотиды, а также их функционализированные производные, на сегодняшний день находят чрезвычайно широкое применение в молекулярной биологии (химический синтез генов, белковая инженерия), бионанотехнологии (ДНК-оригами), диагностике (праймеры, гибридизационные зонды), медицине (терапевтические средства) [13; 14]. Особый интерес вызывают незаряженные аналоги нуклеиновых кислот, остов которых был полностью или частично лишён полианионного характера – например, морфолиновые олигонуклеотиды, пептидо-нуклеиновые кислоты, Р-алкилфосфонатные и фосфорилгуанидиновые аналоги нуклеиновых кислот.

В данном обзоре будут рассмотрены подходы к химическому синтезу нуклеотидных последовательностей, а также варианты химической модификации олигонуклеотидов на примере незаряженных аналогов нуклеиновых кислот, проанализированы их преимущества и недостатки как инструментов для анализа нуклеиновых кислот (в том числе в фермент-зависимых реакциях).

1.1 Краткая история развития методов химического синтеза ДНК

В Кембридже начиная с 1940-ых годов Александр Тодд и его коллеги проводили фундаментальные исследования по химии нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Тодд также провёл множество работ по химическому синтезу витаминов и некоторых коферментов, и, вероятно, в начале исследования химии нуклеиновых кислот основной целью Тодда был синтез нуклеотидного кофермента. Исследователи задались целью синтезировать искусственно короткую последовательность ДНК с природными 3'→5' межнуклеотидными связями, и впервые это совершил в 1955 году А. Тодд в сотрудничестве с А. Михельсоном: они сообщили о синтезе тимидил-л-(3'→5')-тимидина d(ТрТ) (рисунок 1.1, соединение 5) и соответствующего 5'-О-фосфорилированного динуклеотида d(pТрТ) [15]. Схема синтеза приведена на рисунке 1.1.

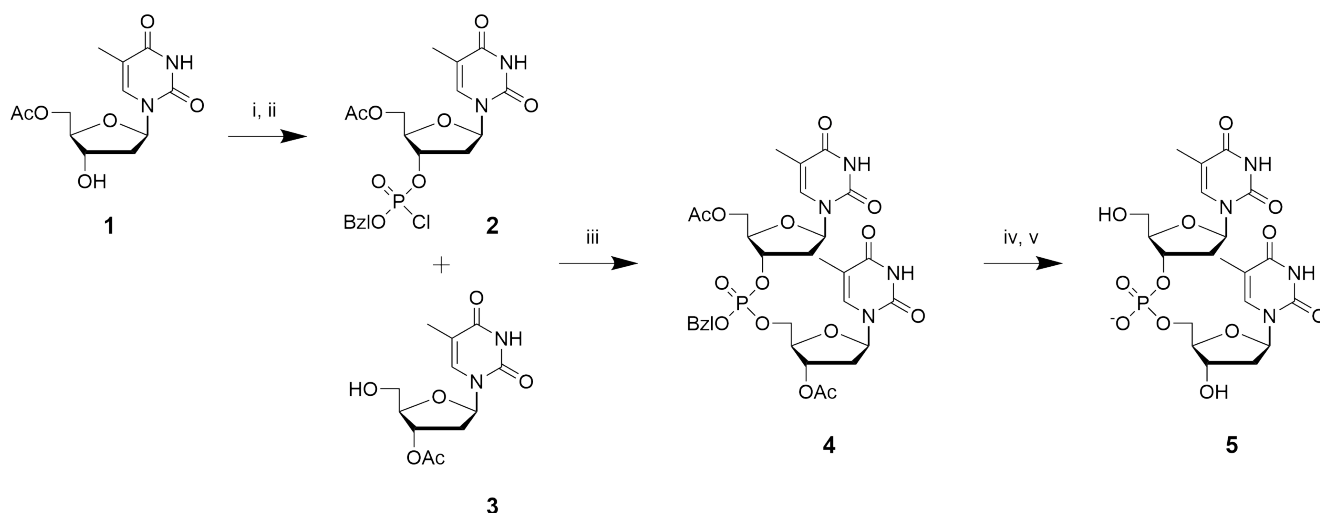


Рисунок 1.1 — Схема получения d(ТрТ), где:

- i – $(\text{BzlO})\text{P}(\text{ONH}_4)_2$, $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$, 2,6-лутидин, бензол
- ii – N-хлорсукцинимид, ацетонитрил, бензол
- iii – 2,6-лутидин, ацетонитрил
- iv – H_2SO_4 , EtOH, H_2O
- v – $\text{Ba}(\text{OH})_2$, H_2O

В данной схеме 5'-О-ацелированный тимидин 1 фосфорилировали по 3'-гидроксигруппе, затем активировали с получением соединения 2, которое вводили в реакцию с 3'-ацелированным тимидином 3 с образованием полностью защищённого динуклеозида 4, деблокирование (т.е. удаление защитных групп) которого в щелочной среде приводило к получению d(ТрТ) 5. Подход к синтезу динуклеотида d(pТрТ) был практически такой же, только соединение

1 было заменено соответствующим дибензиловым эфиром тимидин-5'-фосфата. Дальнейших реакций удлинения цепи для полученных соединений не проводили - возможно, потому, что бензильная защита межнуклеотидной связи (как в соединении **4**) была недостаточно стабильной. Синтетическая стратегия, использованная Тоддом и Михельсоном для синтеза динуклеотида, позже стала известна как «**фосфотриэфирный метод**» синтеза олигонуклеотидных последовательностей.

Также в лаборатории А. Тодда в 1950-ых годах впервые сообщили о синтезе динуклеозида так называемым **Н-фосфонатным методом** [16]. Схема синтеза 5'→5' динуклеозидфосфата **9** приведена на рисунке 1.2.

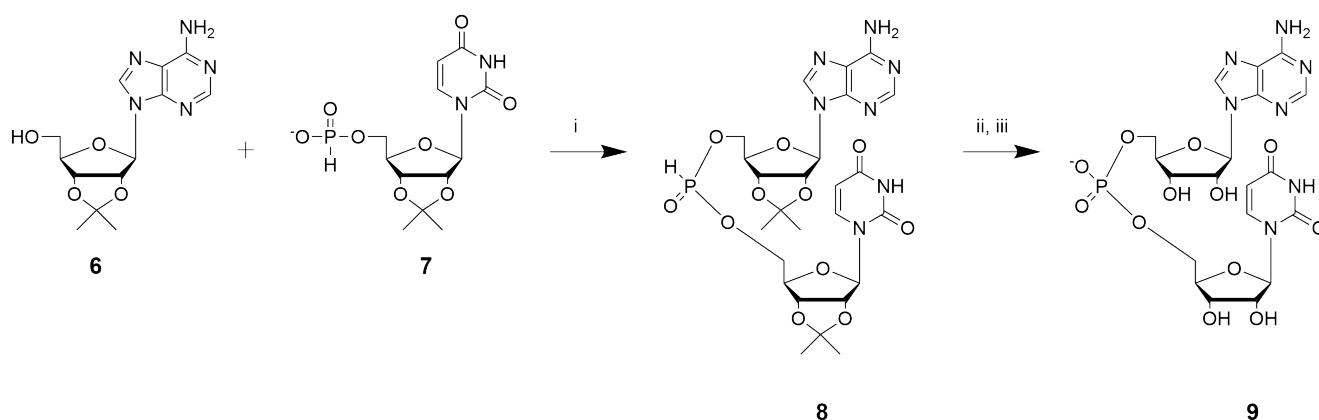


Рисунок 1.2 — Первый опубликованный пример синтеза с помощью Н-фосфонатов, где:

- i – $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$, 2,6-лутидин, ацетонитрил
- ii – N-хлорсукцинимид, 2,6-лутидин, ацетонитрил
- iii – HCl , H_2O

2',3'-Изопропилиден аденозин **6** и 2',3'-изопропилиден уридин-5'-Н-фосфонат **7** вводили в реакцию, после чего полученный продукт **8** окисляли для того, чтобы преобразовать Н-фосфонатную группу в фосфатную, получая в результате 5'→5' динуклеозидфосфат **9**. В целом данный подход на долгое время был заброшен, поскольку Н-фосфонатные межнуклеотидные группы чрезвычайно чувствительны к гидролизу основаниями в водной среде, что создаёт большие трудности при работе. Однако ближе к концу XX века Н-фосфонатный метод будет модифицирован для использования в твердофазном синтезе и тогда получит гораздо более широкое распространение.

Дальнейших исследований по фосфотриэфирному методу, тем не менее, тоже не проводили в течение примерно десятилетия. Это связано, скорее всего, с тем, что получил широкое распространение совершенно другой подход

к синтезу олигонуклеотидов – **фосфодиэфирный метод**, предложенный Г. Корана [17]. В этом подходе межнуклеотидные связи оставляли полностью незащищёнными в течение сборки всей нуклеотидной последовательности: реакцию конденсации проводили между 3'-гидроксигруппой одного нуклеотидного звена и 5'-фосфатом второго звена в присутствии активирующего агента – дициклогексилкарбодиимида или производных толуолсульфонилхлоридов.

Однако Корана и коллеги уделяли много внимания защите азотистых оснований и гидроксигрупп, не участвующих в реакциях роста цепи. В частности, впервые была предложена тритильная защита 5'-гидроксигруппы нуклеозидов, азотистые основания были защищены бензильной (для **A**), пара-анизильной (для **C**) и изобутирильной (для **G**) группами (в соответствии с рисунком 1.3). Остатки тимина оставляли незащищёнными. Позже было обнаружено, что моно- или диметокситритильная группы удаляются при обработке кислотой в более мягких условиях, чем исходная тритильная группа, что приводит к меньшей степени нежелательного гидролиза гликозидных связей. Диметокситритильную группу (рисунок 1.3, **DMTr**) и на сегодняшний день используют для защиты 5'-гидроксигруппы нуклеозидов и олигонуклеотидов.

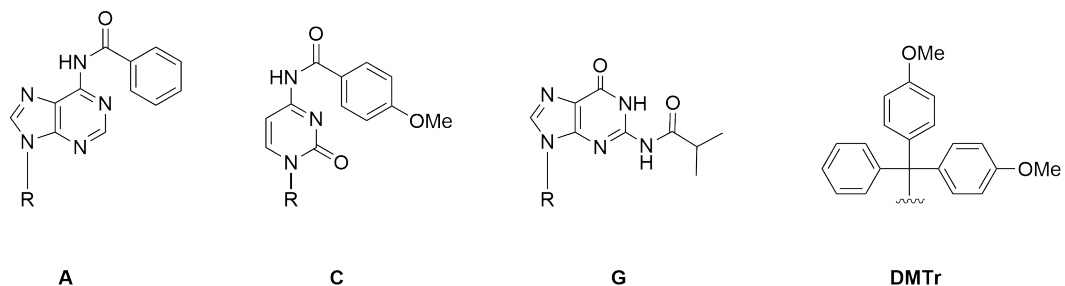


Рисунок 1.3 — Структуры защищённых азотистых оснований и тритильной защиты, используемых в фосфодиэфирном методе синтеза олигонуклеотидов

Из-за побочных реакций, относительно небольших выходов и сложностей в очистке продуктов фосфодиэфирный метод к 1970-ым годам был почти полностью заброшен. Однако важно отметить, что именно фосфодиэфирным методом было синтезировано (как пошаговым способом, так и блочным) множество олигонуклеотидов, использованных для решения важных фундаментальных задач биологии. В частности, Корана внес большой вклад в расшифровку генетического кода, используя химически синтезированные олигодезоксирибонуклеотиды с повторяющимися димерными, тримерными и тетрамерными последовательностями. Также Корана осуществил полный синтез ДНК-дуплекса, соответствующего аланин-транспортной РНК дрожжей.

Эти и подобные работы положили основу многим последующим фундаментальным исследованиям в биологии и биотехнологии.

Во второй половине 1960-ых годов учёные вернулись к исследованию фосфотриэфирного метода синтеза. По большому счёту, стратегия синтеза не претерпевала особых изменений, и суть публикуемых работ заключалась в поиске более удачных защитных групп, более эффективных активирующих агентов и т.п. [18; 19]. В частности, Летзингер проводил синтез с использованием 2-цианозтильной защитной группы для межнуклеотидной связи, Экштейн и Ризк - 2,2,2-трихлорэтильной группы, а Риз и Сэфхилл рассматривали защитные группы на основе арильных заместителей. Компоненты синтеза варьировали, стремясь минимизировать число побочных реакций и получить наибольший выход целевой нуклеотидной последовательности за разумное время. В начале 1970-ых годов проводилось множество работ по нуклеотидному синтезу фосфотриэфирным методом в растворе. Так, например, была синтезирована серия из 29 олигонуклеотидов протяженностью от 10 до 15 звеньев каждый, которые впоследствии с помощью ферментативного лигирования были «собраны» в два ДНК-комплекса протяженностью 77 и 104 пар оснований. Эти комплексы соответствовали двум цепям человеческого инсулина, и в конце 1970-ых эти два гена были успешно экспрессированы.

В 1976 году произошло более существенное изменение, касающееся стратегии фосфорилирования: Летзингер и Лансфорд сообщили, что фосфорилирующие агенты трехвалентного фосфора гораздо более реакционноспособны, чем пятивалентного [20]. Из-за этого фосфотриэфирный метод был преобразован в фосфиттриэфирный (рисунок 1.4). Так, 2-хлорфенил-дихлорфосфит **11** быстро фосфитилировал 5'-защищённый нуклеозид **10** при -78°C , полученное промежуточное соединение **12** вводили в реакцию с 3'-защищенным нуклеозидом **13**, получая полностью защищённый динуклеозидфосфит. Этот продукт сразу же (не выделяя из реакционной смеси) окисляли водным раствором йода, получая полностью защищённый динуклеозидфосфат **14**.

Использование такого фосфитилирующего агента приводило также к образованию побочных продуктов: симметричных 5'-5' и 3'-3' динуклеозидов. Немного позже, в 1981 году, вышеописанный фосфиттриэфирный метод был усовершенствован: Бокаж, основываясь на работах по химии амидов фосфорной кислоты, предложил использовать фосфитамиды нуклеозидов, что позволяло получить динуклеозиды, незагрязнённые симметричными 5'-5' и 3'-3'

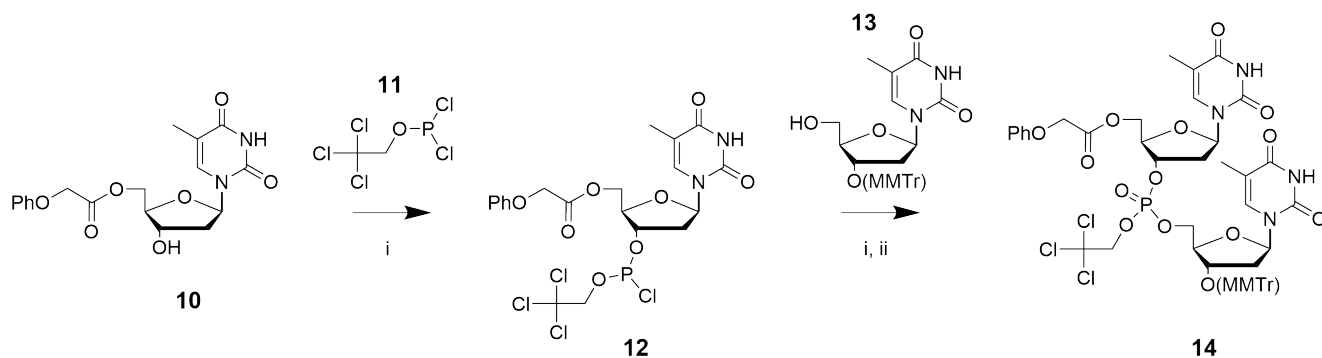


Рисунок 1.4 — Пример синтеза фосфиттриэфирным методом, где:

- i – 2,6-лутидин, ТГФ, -78°C
- ii – 2,6-лутидин, I_2 , ТГФ, H_2O

димерами [21]. Именно в виде 2-цианоэтил N,N-диизопропилфосфитамидов создаются современные нуклеозидные мономеры для синтеза олигонуклеотидов **фосфитамидным методом**. Достаточно быстро этот метод был адаптирован к синтезу олигонуклеотидов на полимерном носителе – стекле с контролируемым размером пор (CPG), содержащем в своей структуре линкерные группы, необходимые для иммобилизации нуклеозида или олигонуклеотида (рисунок 1.5).

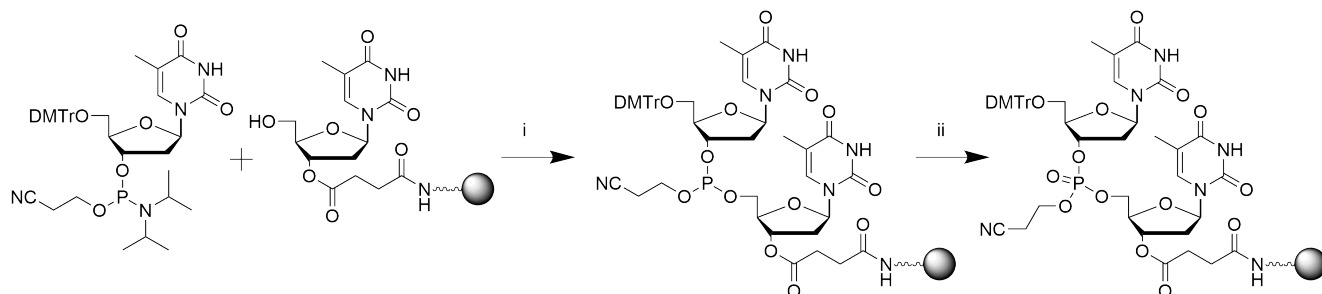


Рисунок 1.5 — Пример синтеза фосфитамидным методом на полимерном носителе, где:

- i – 1H-тетразол, ацетонитрил
- ii – I_2 , ТГФ, H_2O , пиридин

Иммобилизация синтезируемой последовательности позволяет не проводить выделений промежуточных продуктов после каждой реакции удлинения цепи, в связи с чем сильно уменьшается трудоёмкость синтеза длинных последовательностей. Поэтому в современности для получения нуклеотидных последовательностей используют практически исключительно фосфитамидный метод синтеза на полимерном носителе в автоматических ДНК/РНК-синтезаторах. Синтетический цикл включает в себя четыре последовательно повторяющихся этапа:

- **Детритилирование:** удаление диметокситритильной защиты под действием трихлоруксусной кислоты с образованием свободной 5'-гидроксигруппы иммобилизованного нуклеозида или олигонуклеотида;
- **Конденсация:** стадия роста цепи вследствие взаимодействия очередного фосфитамидного нуклеотидного мономера и 5'-гидроксигруппы иммобилизованного нуклеозида в присутствии кислотного катализатора – 1Н-тетразола или производных;
- **Кэпирование:** стадия «блокирования» 5'-гидроксигрупп, не участвовавших в предыдущей стадии роста цепи, под действием уксусного ангидрида;
- **Окисление:** преобразование фосфиттриэфира в фосфотриэфир под действием раствора йода в присутствии воды.

Такой подход позволяет получить олигонуклеотиды с выходом более 90% за считанные часы. Кроме того, устройство и принцип работы ДНК/РНК-синтезаторов позволяют получать и неприродные аналоги нуклеиновых кислот – при помощи либо модифицированных нуклеозидных или ненуклеозидных синтонов, либо альтернативных условий того или иного этапа синтетического цикла.

Разнообразие существующих на сегодняшний день вариантов «модифицированности» нуклеотидной последовательности достаточно велико: в настоящий момент при помощи химического синтеза возможно создавать олигонуклеотиды, содержащие функциональные группы практически любого типа. Разнообразие «внедренных» таким образом свойств (в сочетании со способностью НК к специфической комплементарной гибридизации) делает модифицированные олигонуклеотиды чрезвычайно гибким и эффективным инструментом, пригодным для использования в широком спектре научно-исследовательских и прикладных задач [22].

Среди всего многообразия синтетических аналогов НК особый интерес представляют собой ON, в которых отрицательно заряженный рибозофосфатный остов заменён на электронейтральный. Наиболее известными представителями таких аналогов являются пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) и морфолиновые олигонуклеотиды (МО), а также алкилфосфонаты [23]. Известно, что они обладают повышенным сродством к комплементарным ДНК- или РНК-мишеням, устойчивы к действию нуклеаз и других ферментов. В 2014 году в ИХБФМ СО РАН был предложен новый тип незаряженных аналогов НК –

фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) [9; 10]. В них по межнуклеозидному атому фосфора вводится остаток N,N,N',N'-замещенного гуанидина (1,3-dimethylimidazolidine-2-imine или DMI), что позволяет упразднить отрицательный заряд в отдельных, заданных фосфодиэфирных группах или же во всем углеводо-фосфатном остове. Следует отметить, что ФГО, подобно упомянутым ПНК, МО и Р-алкилфосфонатам, также проявляют устойчивость к действию некоторых нуклеаз, что позволяет рассматривать такие производные олигонуклеотидов как новый перспективный инструмент для молекулярно-биологических исследований и для решения широкого спектра практических задач [24; 25].

В следующем разделе будут рассмотрены способы получения и основные свойства некоторых аналогов нуклеиновых кислот, обладающих частично или полностью электронейтральным остовом, а именно пептидо-нуклеиновых кислот, морфолиновых и Р-алкилфосфанатных аналогов олигонуклеотидов. Будут выявлены ключевые факторы, определяющие доступность того или иного типа незаряженных ON, а также проанализирована перспективность фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов как зондов для анализа нуклеиновых кислот.

1.1.1 Синтез и свойства электронейтральных аналогов нуклеиновых кислот

1.1.1.1 Типы электронейтральных аналогов олигонуклеотидов

Полианионный характер природных нуклеиновых кислот – важный фактор, в значительной степени определяющий как физико-химические, так и биологические свойства ДНК и РНК. Отрицательный заряд углеводо-фосфатного остова способствует эффективной растворимости протяжённых НК в водных растворах, оказывает влияние на пространственную структуру как одноцепочечных, так и двуцепочечных НК вследствие кулоновского отталкивания фосфатных групп. Кроме того, межнуклеотидные фосфатные группы важны для корректного взаимодействия НК с другими биополимерами, поскольку они образуют ионные связи, например, с положительно заряженными аминокислотами. За счёт, в частности, этих связей стабилизируются фермент-субстратные комплексы в процессах репликации, транскрипции, обратной транскрипции и др. Все вышеперечисленные факты положили основу так называемой «теории о полиэлектrolитности гена», утверждающей, что биополимеры должны обладать множественным зарядом для того, чтобы соответствовать процессам дарвиновской эволюции [26].

Разумеется, исключение заряженных фосфатных групп из структуры НК должно повлиять на их свойства – как физико-химические, так и биологические. Глубина влияния зависит, в частности, от степени «сходственности» модифицированного остова и нативного. Таким образом, существующие на сегодняшний день незаряженные аналоги нуклеиновых кислот можно условно разделить на две группы:

1. Олигонуклеотиды с «нерибозным» незаряженным остовом

К ним относятся известные пептидо-нуклеиновые кислоты и морфолиновые олигонуклеотиды. Примеры структур приведены на рисунке 1.6.

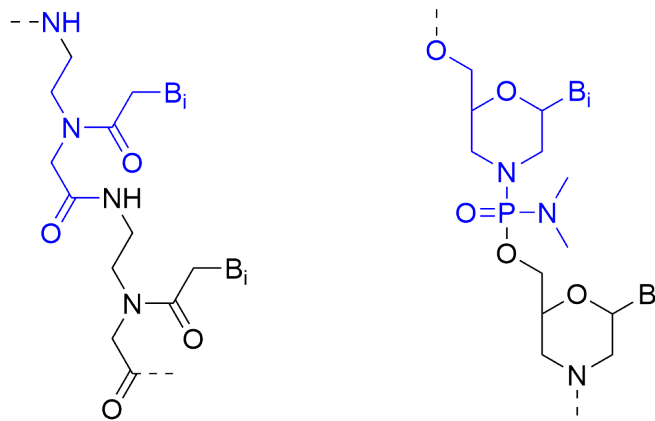


Рисунок 1.6 — Примеры пептидо-нуклеинового (слева) и морфолинового (справа) незаряженного остова. B_i – азотистое основание

Как видно из рисунка 1.6, и ПНК, и МО в своей структуре не содержат остатка рибозы или дезоксирибозы: ПНК обладают остовом на основе N-(2-аминоэтил)глицина, а в МО рибозное кольцо было преобразовано в остаток морфолина. Эти аналоги НК были разработаны в конце 20-ого века: пептидо-нуклеиновые кислоты были предложены Питером Нильсеном и коллегами в 1992 году [27], морфолиновые олигонуклеотиды – Джеймсом Саммертоном в 1989 году [28].

2. Олигонуклеотиды с «рибозным» незаряженным остовом

В них «удаление» отрицательного заряда достигается введением модификаций именно по межнуклеотидной фосфатной группе, без изменений в структуре пятичленного цикла рибозы. К этой группе относятся, например, Р-алкилфосфонатные аналоги НК, а также фосфорилгуанидиновые аналоги (рисунок 1.7).

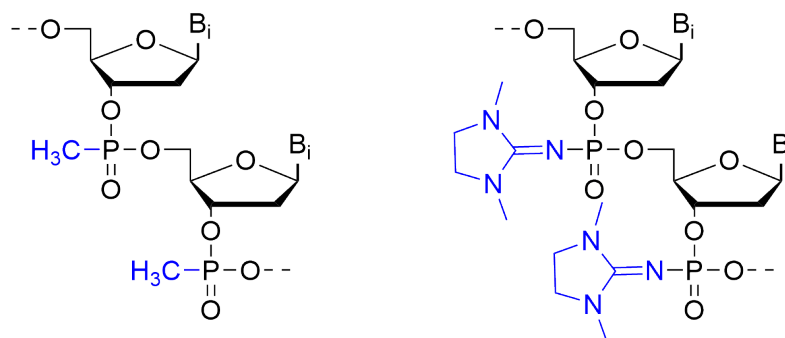


Рисунок 1.7 — Структуры Р-метилфосфонатных аналогов НК (слева) и фосфорилгуанидиновых аналогов (справа). B_i – азотистое основание

Ясно, что такие незаряженные аналоги НК должны быть в большей степени приближены по своим свойствам к нативным олигонуклеотидам, поскольку

общий характер остова подвергся не столь радикальным изменениям, как в случае, например, пептидо-нуклеиновых кислот. Синтез Р-алкилфосфонатных аналогов НК осуществил Пол Миллер в 1979 году [29]. Фосфорилгуанидиновые аналоги олигодезоксирибонуклеотидов были предложены в 2014 году группой авторов [10].

Ко второй группе следует отнести и целый ряд других производных НК, в которых межнуклеотидная фосфатная группа заменена на различные содержащие линкеры, не содержащие фосфор: например, серосодержащие производные – сульфамиды и сульфаматы [30], производные на основе амидных или карбаматных линкеров, формацеталей и тиоформацеталей и другие [31].

Кроме того, возможно выделить также третью группу незаряженных производных НК, содержащих в равном количестве отрицательно заряженные фосфатные группы и положительно заряженные заместители и обладающих, таким образом, суммарной электронейтральностью [32].

Несмотря на то, что разнообразие незаряженных аналогов НК достаточно велико, во многих случаях они не получили распространения в научно-исследовательских работах либо из-за сложности синтетических схем, либо из-за неконкурентной эффективности гибридизации с комплементарными мишенями. В следующих разделах данного обзора будут рассмотрены только 4 типа незаряженных производных НК, а именно пептидо-нуклеиновые кислоты, морфолиновые олигонуклеотиды, алкилфосфонатные и фосфорилгуанидиновые аналоги олигонуклеотидов. Будут рассмотрены основные способы получения того или иного типа незаряженных НК, а также проанализированы ключевые физико-химические и биологические свойства, касающиеся участия незаряженных аналогов олигонуклеотидов в реакциях, катализируемых НК-процессирующими ферментами.

1.1.1.2 Способы получения морфолиновых аналогов олигонуклеотидов

Согласно работам Дж. Саммертона, предшественниками морфолиновых нуклеотидных синтонов являются соответствующие рибонуклеозиды. Преобразование рибозного цикла в морфолиновый включает в себя три ключевых стадии: «раскрытие» рибозного кольца за счёт окисления 2'-3' диольного фрагмента, реакция получаемого диальдегида с аммиаком с образованием 6-членного морфолинового цикла, восстановительное удаление 2'- и 3'-гидроксигрупп (рисунок 1.8).

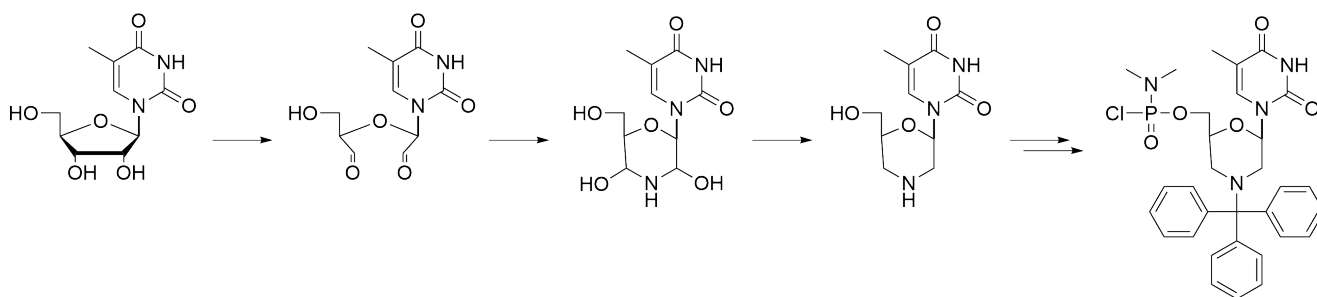
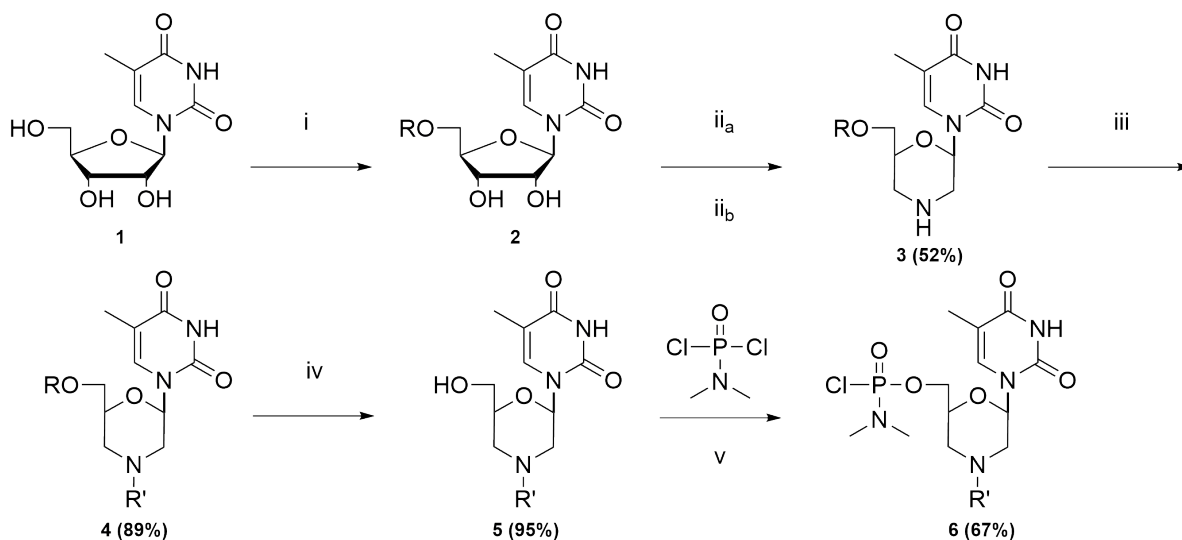


Рисунок 1.8 — Схема синтеза морфолинового нуклеотидного мономера

Эти три стадии осуществляли без промежуточных выделений, после чего проводили введение необходимых тритильной (или монометокситритильной) защитной группы и активирующего фрагмента фосфамидхлорида. Пример полной синтетической схемы, основанной на методике Саммертона [33], приведен на рисунке 1.9.



R = TBDPSCl

R' = Tr

Рисунок 1.9 — Стадии синтеза морфолинового мономера, где:

- i – TBDPSCl, имидазол, диметилформаид
- ii_a – NaIO₄, (NH₄)₂B₄O₇, CH₃OH
- ii_b – NaCNBH₃, CH₃COOH, CH₃OH
- iii – TrCl, Et₃N, диметилформаид
- iv – TBAF, тетрагидрофуран
- v – LiBr, DBU, CH₃CN, CH₂Cl₂

TBDPSCl – трет-бутилдифенилсилил хлорид; *TrCl* – три-
тил хлорид, *TBAF* – тетрабутиламмоний фторид; *DBU* –
1,8-дiazобциклоундек-7-ен

На первой стадии исходный рибонуклеозид **1** силилируют по 5'-гидроксигруппе. Для этого к раствору рибонуклеозида в диметилформамиде медленно добавляют имидазол, охлаждают до 10 °С и по каплям вносят трет-бутилдифенилсилил хлорид. Полученную смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение 6 часов, контролируя по ТСХ глубину протекания реакции. Полученный продукт очищают от растворителей и избытка силилирующего агента и, без дополнительного выделения защищенного рибонуклеозида **2**, используют на следующей стадии – преобразовании рибозного кольца в морфолиновый цикл. Для этого соединение **2** растворяют в смеси метилового спирта и дихлорметана (4:1) и вносят метапериодат натрия и тетраборат натрия в атмосфере аргона. Смесь перемешивают 2 часа при комнатной температуре, затем фильтруют над целитовым фильтром и концентрируют при пониженном давлении. Затем также в атмосфере аргона добавляют цианборгидрид натрия и уксусную кислоту при перемешивании. Образование

продукта **3** контролируют с помощью ТСХ. По достижении полного восстановления интермедиата **2**, реакционную смесь очищают с помощью экстракции и колоночной хроматографии. Затем с помощью стандартных приёмов осуществляют тритилирование морфолинового звена по атому азота с образованием защищенного морфолинового нуклеозида **4**, удаляют 5'-концевую защитную группу с помощью тетрабутиламмоний фторида и полученное соединение **5** фосфорилируют по гидроксигруппе, получая активированный синтон **6**.

Важно отметить, что в вышеописанном синтетическом подходе, как и в оригинальных работах Дж. Саммертона, предполагается получение именно 5'-фосфорилированного морфолинового производного нуклеотида. Такие синтоны могут быть использованы в дальнейшем для автоматического синтеза олигонуклеотидных последовательностей на твердофазном носителе, причём синтетический цикл включает всего две повторяющиеся стадии – снятие тритильной защиты и конденсацию (стадию роста цепи). Однако такой подход оказывается несовместим со стандартным фосфитамидным протоколом синтеза олигонуклеотидов, поскольку фосфитамидный протокол предполагает синтез в другом направлении: от 3'-концевого звена, иммобилизованного на полимерном носителе, к 5'-концу последовательности. Структура же морфолинового мономера, предложенная Саммертоном, позволяет осуществлять синтез только в обратном направлении. Из-за этого не представлялось возможным получение химерных олигонуклеотидов, содержащих как морфолиновые звенья, так и нативные фосфодиэфирные. Также из-за несовместимости с фосфитамидным подходом к синтезу затруднена возможность получения «полифункциональных» производных, то есть содержащих не только морфолиновую модификацию остова, но и какие-либо ещё функционализированные ненуклеотидные заместители. Для фосфитамидного метода синтеза существует множество доступных и хорошо описанных ненуклеотидных мономеров, содержащих, например, флуоресцентные красители, тушители флуоресценции, липофильные заместители, группировки для конъюгации олигонуклеотидов с другими молекулами. Различие в структуре морфолиновых и фосфитамидных синтонов не позволяет использовать уже известные способы введения таких функциональных групп и требует разработки уникальных, совместимых именно со стратегией синтеза морфолиновых производных, ненуклеотидных вставок. Таким образом, несовместимость синтеза морфолиновых производных и «классического» фосфитамидного метода синтеза олигонуклеотидов и их про-

изводных является значительным недостатком, ограничивающим многообразие функциональных аналогов НК на основе морфолинового остова.

Тем не менее, в 2016 году авторы работы [34] предложили альтернативный метод получения морфолиновых олигонуклеотидов при помощи N-фосфитамидных производных морфолиновых мономеров. Для получения мономера использовали защищенный рибонуклеозид, содержащий 5'-концевую диметокситритильную группу (рисунок 1.10).

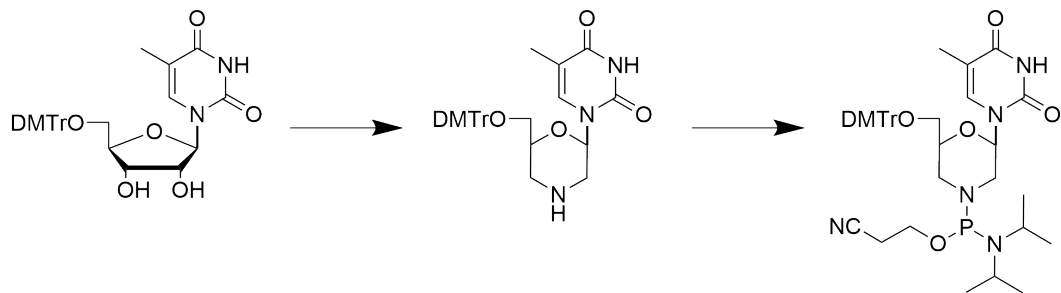


Рисунок 1.10 — Схема получения N-фосфитамидного морфолинового мономера; *DMTr* – диметокситритильная защитная группа

Стратегия получения морфолинового цикла в данной работе полностью совпадала с оригинальным подходом Саммертона. Введение фосфитамидного остатка проводили, обрабатывая морфолиновое звено O-цианэтил-бис(N,N-диизопропиламино)фосфитом. Получаемый таким образом мономер по своей структуре схож со стандартными фосфитамидными мономерами и может быть использован в рамках фосфитамидного синтеза олигонуклеотидов на полимерном носителе. Однако в случае стандартного синтетического цикла на этапе окисления была бы получена заряженная межнуклеотидная связь. Чтобы сохранить ключевое свойство морфолиновых олигонуклеотидов – отсутствие заряда – потребовалось внести изменения в условия синтетического цикла на разных этапах, в частности ввести этап борирования фосфитдиэфирной группы, чтобы впоследствии на этапе пост-синтетического окисления йодом в присутствии диметиламина получить незаряженную фосфатамидную группу. Общая стратегия синтеза представлена на рисунке 1.11.

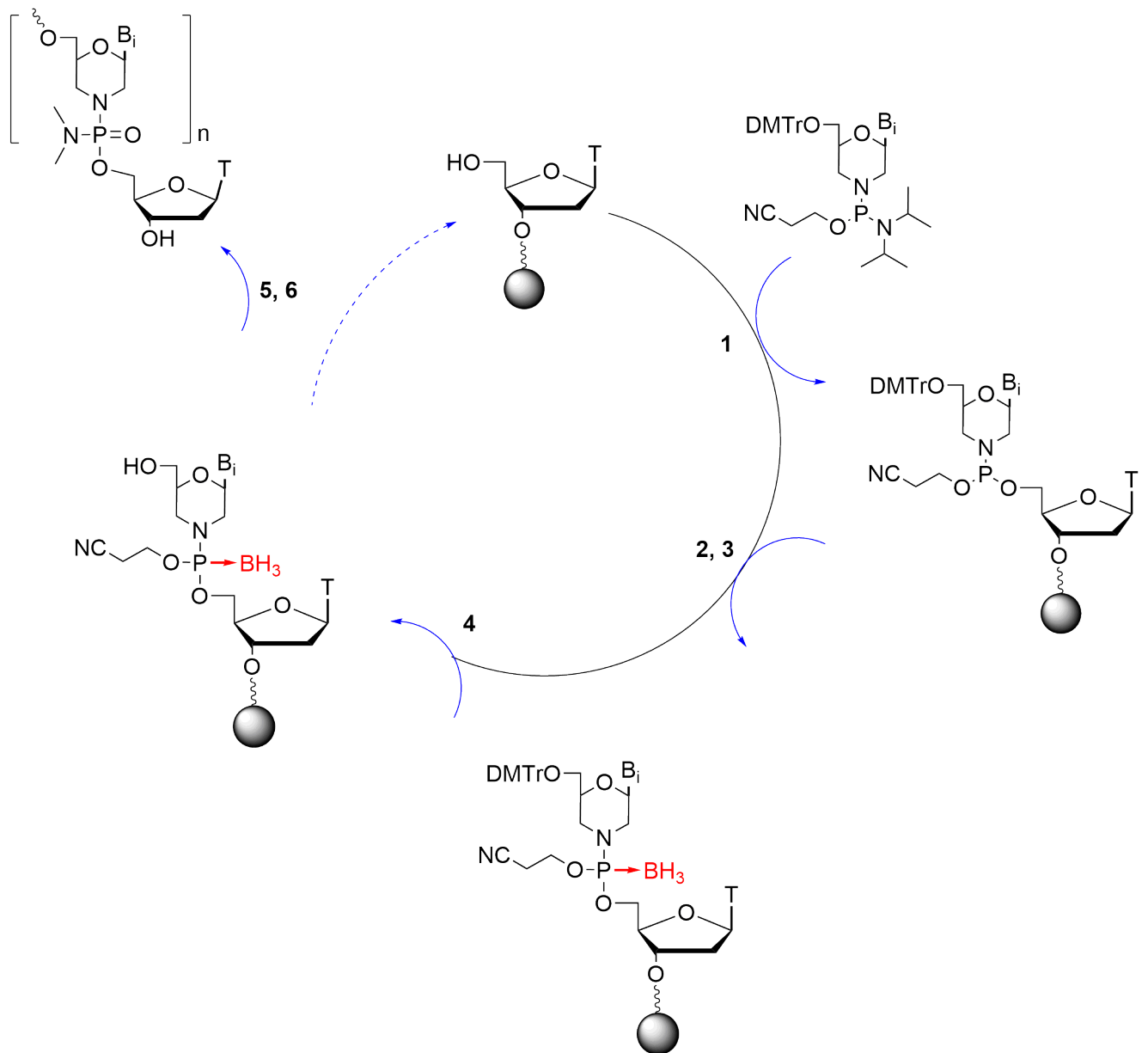


Рисунок 1.11 — Схема синтетического цикла, предложенный в работе [34], для синтеза морфолиновых олигонуклеотидов с использованием модифицированного фосфитамидного метода. 1 – стадия конденсации, 2 – стадия борирования, 3 – стадия кэпирования, 4 – стадия детритилирования, 5 – деблокирование защитных групп, 6 – удаление олигонуклеотидов с полимерного носителя.

Используя попеременно и стандартные условия фосфитамидного синтеза, и вышеописанные модифицированные условия, авторы получили целый ряд как гомополимерных, так и гетерополимерных олигонуклеотидов протяженностью от 15 до 21 звеньев, среди которых были полностью незаряженные морфолиновые последовательности, так и химерные, содержащие от 4 до 8 незаряженных звеньев. Причем химерные олигонуклеотиды обладали различной архитектурой: морфолиновые звенья были расположены блочно вблизи 3'- и 5'-концов

последовательности, или внутри последовательности, или равномерно распределенные по длине олигонуклеотида.

Весьма вероятно, что развитие методов синтеза химерных олигонуклеотидных структур позволит расширить применение морфолиновых олигонуклеотидов, поскольку присутствие одновременно и заряженных, и незаряженных остатков позволит гибко регулировать многие свойства получаемых олигонуклеотидов – по меньшей мере, их растворимость. Действительно, сами по себе морфолиновые олигонуклеотиды, разработанные первоначально как инструмент для антисенс-технологий, наряду с существенными достоинствами – устойчивостью к действию нуклеаз, повышенной гибридизационной способностью [35], – обладают и немаловажным недостатком – ограниченной растворимостью в водных растворах. Как правило, протяженность МО не превышала 20-25 звеньев именно из-за проблем с растворимостью. Кроме того, не обнаружено работ, в которых морфолиновые олигонуклеотиды были бы задействованы в качестве субстратов для какого-либо из распространенных ферментов, процессирующих НК: полимераз, лигаз, киназ, др. Вероятно, это связано именно с отсутствием заряда в остове и в целом инородной структурой морфолинового звена, ведь фермент-субстратные комплексы как правило обладают очень консервативной структурой, стабилизированной, в частности, ионными взаимодействиями. Химерные структуры, вероятно, будут лишены этих ограничений, и, таким образом, область возможного применения МО станет более широкой.

1.1.1.3 Способы получения пептидо-нуклеиновых кислот

Пептидо-нуклеиновые кислоты также обладают уникальным нерибозным остовом, представляющим собой линейный полимер на основе N-(2-аминоэтил)глицина. Для получения нуклеотидных звеньев с таким остовом в качестве предшественника используют природные азотистые основания (рисунок 1.12).

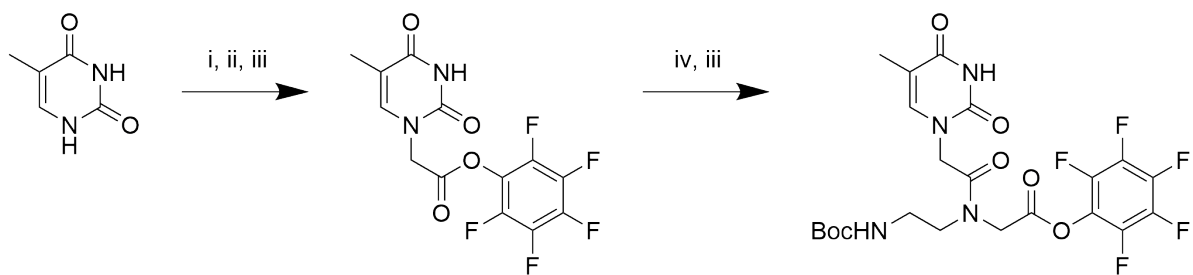


Рисунок 1.12 — Способ получения мономера с «пептидным» остовом, где:

- i – $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$, K_2CO_3 , диметилформамид
- ii – NaOH
- iii – $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, дициклогексилкарбодиимид, диметилформамид
- iv – $\text{BocNH}-(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, Et_3N , диметилформамид
(*Boc* – трет-бутилоксикарбонильная защитная группа)

Ключевой стадией синтеза ПНК мономеров является селективное алкилирование по атому азота (N9 для пуринов, N1 для пиримидинов). В оригинальных работах Питера Нильсена [27] азотистые основания обрабатывали метиловым эфиром бромуксусной кислоты в присутствии карбоната калия в диметилформамиде в течение 24 часов. Продукт алкилирования промывали водной щелочью 10 минут, после чего активировали пентафторфенолом в присутствии дициклогексилкарбодиимида в диметилформамиде в течение 3 часов. Получаемый пентафторфениловый эфир вводят в реакцию с Boc-защищённым N-(трет-бутилоксикарбониламиноэтил)глицином, в результате чего образуется мономерное «нуклеотидное» звено с пептидным остовом. Для дальнейшего синтеза олигонуклеотидных цепей используют мономеры в активированной форме, получаемой в результате обработки пентафторфенолом или другими активирующими агентами.

Синтез олигонуклеотидных последовательностей на основе ПНК-мономеров возможно проводить как в «ручном», так и в автоматическом режимах. Ясно,

что автоматический метод синтеза ПНК значительно отличается от фосфитамидного метода синтеза олигонуклеотидов уже в силу того, что ПНК, обладая пептидным остовом, нуждаются в совершенно других защитных группах и других условиях конденсации. По существу, синтез ПНК приближен скорее к синтезу полипептидной цепи, нежели чем к классическому олигонуклеотидному синтезу. Методику автоматического синтеза ПНК предложили в 1998 году Мэйфилд и Кори [36] (рисунок 1.13).

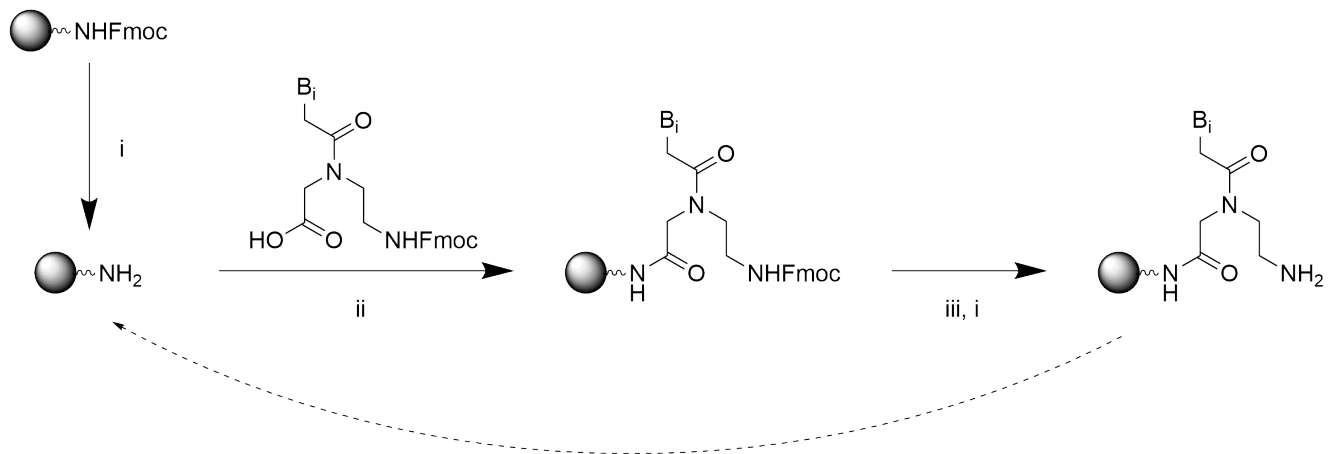


Рисунок 1.13 — Схема автоматического синтеза ПНК методом Мэйфилда и Кори, где:

- i – снятие защитной группы Fmoc – 20% пиперидин в диметилформамиде
- ii – конденсация – гексафторфосфат азабензотриазол тетраметилмочевины, 0.2 М диизопропилэтиламин, 0.3 М 2,6-лутидин, диметилформамид, N-метилпирролидон
- iii – кэпирование – 5% уксусный ангидрид, 6% 2,6-лутидин в диметилформамиде (*Fmoc* – флуоренилметилоксикарбонильная защитная группа)

Полимерный носитель, содержащий Fmoc-защищённую аминогруппу, деблокируют путём обработки 20% пиперидином. Затем аминогруппа полимера взаимодействует с карбоксильной группой очередного ПНК-мономера в присутствии O-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилмочевины гексафторфосфата с образованием пептидной связи. Для блокирования последовательностей, в которых присоединения очередного мономера не произошло, предусмотрена стадия кэпирования – ацилирование аминогрупп уксусным ангидридом. Затем этапы деблокирования, конденсации и кэпирования повторяются последовательно до достижения нужной длины олигонуклеотида. Снятие полученных олигонуклеотидов с поверхности полимера проводят, обрабатывая полимерный носитель 20% раствором м-крезола в трифторуксусной кислоте.

Таким образом авторы [36] получили серию различных олигонуклеотидных последовательностей протяженностью до 30 звеньев. Более того, были получены также «блочные» химерные структуры ПНК с полипептидами (15 и 19 аминокислотных остатков). Действительно, наличие в структуре ПНК «псевдо 5'-концевой» аминогруппы позволяет легко проводить конъюгирование ПНК с другими молекулами: например, используя метод активированных эфиров, можно ввести флуоресцентные красители, остаток биотина [37]. Тем не менее, методика синтеза ПНК остается уникальной и не может быть совмещена с другими протоколами синтеза олигонуклеотидов и их аналогов. Для того, чтобы получить химеры пептидо-нуклеинового и нативного остовов, необходимо разрабатывать специальные мономерные звенья. Например, в работе [38] предложен синтез ПНК-мономера, в котором «псевдо 5'» аминогруппа заменена на защищенную гидроксигруппу. В работе [39] использован также и модифицированный дезоксирибонуклеозидный мономер: в нём, наоборот, 5'-концевая гидроксигруппа заменена на защищенную аминогруппу (рисунок 1.14).

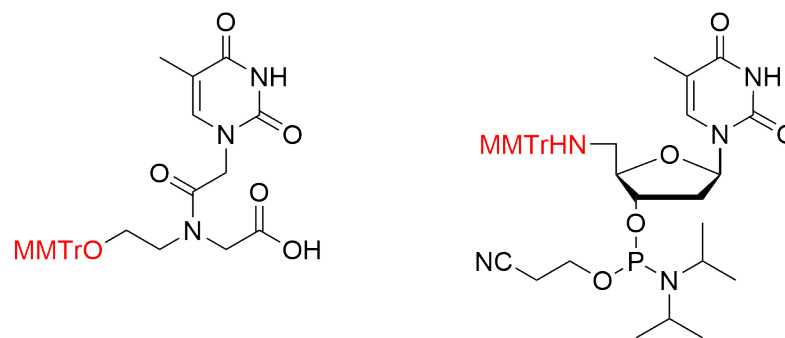


Рисунок 1.14 — Структуры мономеров для синтеза химерных ПНК-ДНК последовательностей. *MMTr* – монометокситритильная защитная группа

Используя подобные мономеры, авторы [39] получили в автоматическом режиме недлинные (6-10 звеньев) гомотимидилаты, в которых ПНК и ДНК звенья чередуются. В более старых работах получали как правило только «блочные» химерные олигонуклеотиды, состоящие из отдельной «ПНК-части» и «ДНК-части». Для соединения таких блоков использовали, в частности, химическое лигирование в присутствии комплементарной «матричной» последовательности [40].

Таким образом, автоматический синтез ПНК и в настоящее время является достаточно «изолированным», требующим специального подхода. Синтез химерных последовательностей является достаточно трудным, поскольку необходимо задействовать специальные мономеры. Кроме того, синтез ПНК

задействует уникальные растворители и активаторы, принципиально отличающиеся от таковых в фосфитамидном синтезе олигонуклеотидов, и в случае автоматического синтеза химерных последовательностей необходимость задействовать одновременно такое количество несовпадающих реагентов является технически трудной.

Тем не менее, ПНК, как и морфолиновые олигонуклеотиды, являются мощным инструментом для антисенс-подавления экспрессии генов [41; 42]. Они также стабильны к действию нуклеаз, обладают повышенным сродством к комплементарным НК-мишеням, но малорастворимы в водных растворах и склонны к агрегированию. Вероятно, что, как и в случае с морфолиновыми олигонуклеотидами, развитие методов синтеза химерных и полифункциональных молекул на основе ПНК позволило бы в значительной степени устранить эти недостатки и, таким образом, расширило бы область возможного применения ПНК в исследовательских работах, терапии и диагностике.

1.1.1.4 Способы получения Р-алкилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов

Впервые синтез модифицированного Р-метирированного динуклеотида осуществил Пол Миллер в 1979 году, причем на тот момент был использован фосфодиэфирный подход к сборке нуклеотидной последовательности [29]. Ниже приведена схема синтеза Пола Миллера (рисунок 1.15).

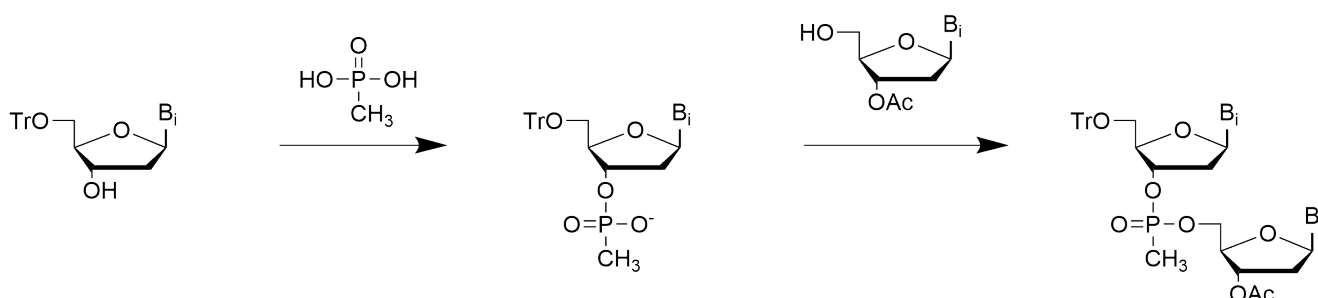


Рисунок 1.15 — Синтез Р-метирированного динуклеотида, П. Миллер [29]. B_i — защищённое азотистое основание, Tr — тритильная защитная группа

5'-защищённый нуклеозид фосфорилировали метилфосфорной кислотой в присутствии дициклогексилкарбодиимида, получая модифицированный Р-метирированный мономер — 5'-третирированный нуклеозид 3'-метилфосфат. Для получения динуклеотида осуществляли конденсацию с 3'-ацелированным нуклеозидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида, или триизопропилбензилсульфохлорида, или мезитиленсульфонилтетразолида.

Немного позже — для того, чтобы перейти на более эффективный фосфитамидный метод и автоматический режим синтеза олигонуклеотидов, — был предложен подход к получению Р-метилфосфитамидных мономеров (рисунок 1.16) [43].

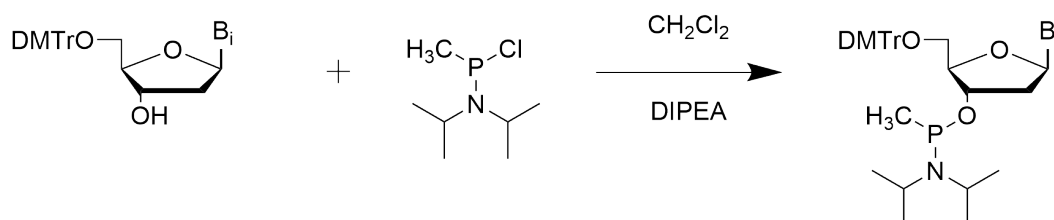


Рисунок 1.16 — Синтез Р-метирированного фосфитамидного мономера. B_i — защищённое азотистое основание, $DMTr$ — диметокситритильная защитная группа, $DIPEA$ — диизопропилэтиламин

5'-Защищённый нуклеозид растворяли в безводном дихлорметане, содержащем 4 эквивалента диизопропилэтиламина, добавляли N,N-диизопропилметилфосфин хлорид в небольшом избытке. Полноту протекания контролировали при помощи ТСХ: полное фосфитилирование исходного нуклеозида достигалось за 30 минут. Продукт реакции очищали, используя методы экстракции и осаждения. Выход целевого фосфитамидного мономера составлял от 50 до 85%, чистота продукта – более 95%.

Полученные таким образом Р-метилфосфитамиды были использованы для автоматического синтеза олигонуклеотидов на полимерном СРG-носителе. Важно, что данный тип модификаций не требует дополнительных изменений в протоколе фосфитамидного синтеза: введение модификации в состав олигонуклеотида достигается за счёт использования специального мономера, однако условия его обработки принципиально ничем не отличаются от «стандартных» условий. В работе [43] авторы описывают синтез нонамера 5'-AT₈-3', в котором тимидилатный тракт по всем межнуклеотидным атомам фосфора метилирован.

Тем не менее, поскольку протокол олигонуклеотидного синтеза не был подвержен существенным изменениям, возможно введение других функциональных заместителей [44]. Более того, возможно получение химерных последовательностей различной природы. Так, например, в работе [45] был проведен автоматический твердофазный синтез серии 9-звенных олигонуклеотидов, содержащих в качестве модификаций либо так называемые «замкнутые» звенья, либо Р-метилированные звенья, либо и то, и другое одновременно. Из множества работ было известно, что незаряженные Р-метилированные аналоги НК, будучи стабильными к действию нуклеаз, обладают критичным недостатком – они менее эффективно гибридизуются с комплементарной РНК-мишенью [46]. «Замкнутые» нуклеиновые кислоты, напротив, образуют значительно более стабильные комплементарные комплексы, чем нативные олигонуклеотиды, но они недостаточно стабильны к действию нуклеаз. Авторы продемонстрировали, что, комбинируя оба эти варианта модификации НК, возможно «совместить» их сильные стороны и создать химерные конструкции, обладающие повышенным сродством к РНК-мишени и, в то же время, стабильные к действию 3'-экзонуклеаз.

Важной особенностью олигонуклеотидов, содержащих Р-алкилфосфонатные звенья, является хиральность атомов фосфора: в работе Миллера было показано, что модифицированные Р-метилфосфонатные динуклеотиды

представляют собой смесь двух диастереомеров, обладающих различной хроматографической подвижностью. При помощи хроматографических методов удалось получить индивидуальные диастереомеры, благодаря чему стали развиваться методики синтеза Р-метилфосфонатов, обогащенных той или иной стерической формой. В таких работах приведены также данные о термической стабильности комплементарных комплексов, содержащих различные оптические изомеры Р-алкилфосфонатов: показано, что наличие оптически чистых R_p центров приводит к увеличению стабильности комплекса, в то время как S_p конфигурация ассиметрических центров, наоборот, значительно дестабилизирует комплекс за счет, видимо, разрыхляющих взаимодействий метильной группы возле атома фосфора и атомов водорода рибозного остова [46; 47]. Также диастереомеры Р-алкилфосфонатов могут отличаться по своим субстратным свойствам: в работе [48] исследовано взаимодействие модифицированных димеров ТрТ и таких ферментов, как Т4-полинуклеотид киназа, фосфодиэстераза змеиного яда, фосфодиэстераза селезенки. Показано, что оба диастереомера фосфорилируются Т4-полинуклеотидкиназой в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, устойчивы к действию фосфодиэстеразы селезенки. Фосфодиэстераза змеиного яда, в свою очередь, медленно гидролизует один из диастереомеров в течение 24 часов, после чего дальнейшего гидролиза метилфосфонатного дитимидилата не происходило даже при повторном добавлении фермента. Более того, в работах Пола Миллера исследованы субстратные свойства Р-алкилфосфонатов в реакции полимеризации, катализируемой ДНК полимеразой I *E. Coli*. В работе [49] рассмотрены частично модифицированные Р-метилированные олиготимидилаты вида $5'\text{-Тр}(\text{ТрТр})_n\text{Т}(\text{рТ})_m\text{-3}'$ (где \mathbf{p} – межнуклеотидная метилфосфонатная группа) в качестве праймеров для ДНК-зависимой ДНК-полимеризации. Показано (таблица 1), что частично незаряженные олиготимидилаты могут являться праймерами в том случае, если в структуре олигонуклеотида сохранены по крайней мере два нативных фосфодиэфирных заряженных остатка возле 3'-гидроксигруппы праймера.

Предполагается, что первые 3-6 нуклеотидных звеньев вблизи 3'-гидроксигруппы праймера участвуют в образовании ионных связей с ферментом, критически важных для стабилизации фермент-субстратного комплекса или для последующей транслокации фермента. Важно отметить, что в случае олиготимидилата $5'\text{-Тр}(\text{ТрТр})_3\text{Т}(\text{рТ})_5\text{-3}'$ кажущаяся энергия активации реакции полимеризации ДНК полимеразой I зависела от используемого диасте-

Таблица 1 — Способность Р-метилованных олиготимидилатов инициировать ДНК-зависимую ДНК-полимеризацию по матрице poly(dA). Данные адаптированы из работы [49].

Праимер, 5'-3'	Относительная скорость полимеризации ДНК полимеразой I <i>E. Coli</i>	
	Изомер I	Изомер II
(Tp) ₁₁ T	1.000	1.000
Tp(TpTp) ₄ T	0.000	0.000
Tp(TpTp) ₃ TpT	0.000	
Tp(TpTp) ₃ T(pT) ₂	0.011	0.000
Tp(TpTp) ₃ T(pT) ₃	0.120	0.000
Tp(TpTp) ₃ T(pT) ₄	0.535	0.047
Tp(TpTp) ₃ T(pT) ₅	0.984	0.331

реомера, что свидетельствует о том, что на стабильность фермент-субстратного комплекса может влиять пространственная организация модифицированных фосфодиэфирных групп. Также в работе [50] показано, что частично модифицированные Р-алкилфосфонатные аналоги могут быть использованы в качестве матричной цепи в реакции полимеризации, хотя скорость и эффективность реакции будет значительно ниже, чем в случае нативного ДНК-субстрата. Таким образом, уникальные свойства отдельных диастереомеров Р-алкилфосфонатных аналогов НК в сочетании с достаточно гибкой и нетрудоёмкой процедурой их получения делают эти производные многогранным и перспективным объектом для множества различных исследований.

1.1.1.5 Способы получения фосфорилгуанидиновых аналогов олигонуклеотидов

В 2014 году был предложен новый незаряженный аналог НК, содержащий модификацию по межнуклеотидному атому фосфора, – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды. В них атом кислорода фосфатной группы «заменён» на органический заместитель, причём введение этой модификации не требует создания специальных нуклеозидных мономеров и уникальных подходов к сборке нуклеотидных последовательностей. Модификация производится в ходе фосфитамидного нуклеотидного синтеза на этапе окисления (рисунок 1.17).

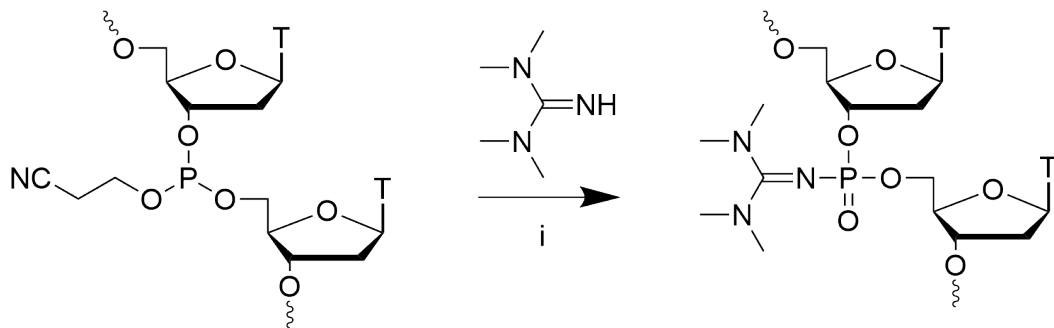


Рисунок 1.17 — Получение фосфорилгуанидинового звена в составе олиготимидилата, где:
i – I₂, пиридин

В работе [9] показано, что окисление дитимидилатфосфиттриэфира йодом в пиридине в присутствии 1,1,3,3-тетраметилгуанидина приводит к образованию динуклеотида с межнуклеотидной фосфорилтетраметилгуанидиновой группой. Были получены 6- и 20-звенные гомотимидилаты, содержащие одну или две модификации в различных позициях, и исследованы методами ОФ-ВЭЖХ и термической денатурации комплементарных ДНК-комплексов с оптической регистрацией сигнала. Показано, что наличие одной ФГ-группы приводит к увеличению времени удерживания тринуклеотида на фазе C-18 по сравнению с немодифицированным аналогом (рисунок 1.18) [51].

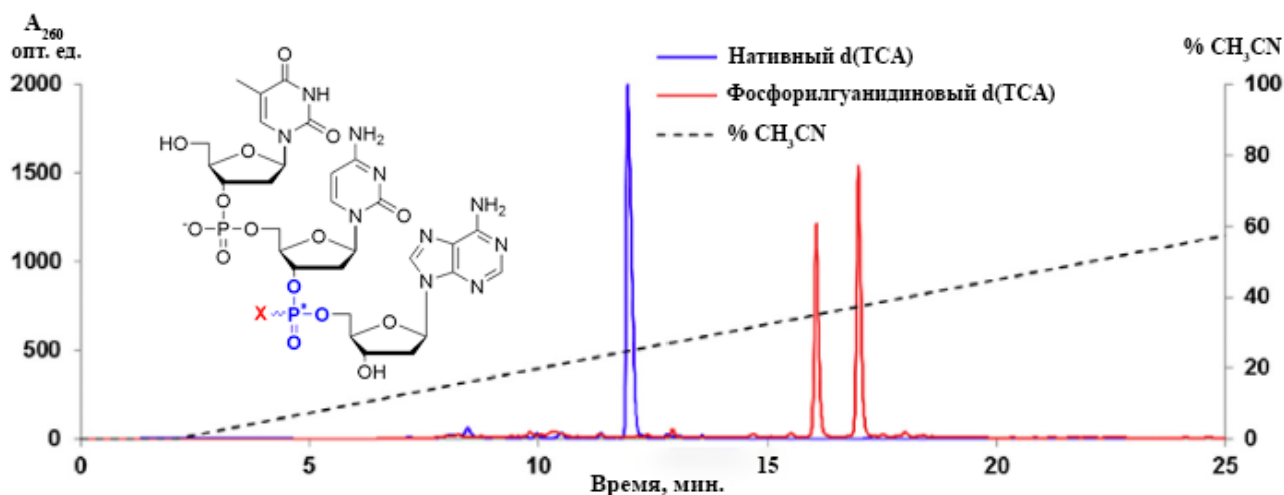


Рисунок 1.18 — Профиль ОФХ нативного тринуклеотида (d(TCA)) и содержащего фосфорилгуанидиновую группу.

Изображение адаптировано из работы [51].

Причем на профиле ОФХ в случае ФГ-замещённого олигонуклеотида наблюдали два близко расположенных пика сравнимой интенсивности, соответствующие двум диастереомерным формам, возникающим вследствие хиральности атома фосфора в составе фосфорилгуанидина. Стабильность комплементарных ДНК-комплексов для гомотимидилатов dT₂₀, содержащих ФГ-группу либо вблизи 3'-конца последовательности, либо вблизи середины, близка к таковой для немодифицированного комплекса в растворе с высокой ионной силой (10 мМ какодилат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 5 мМ хлорид магния). При этом индивидуальные диастереомеры обладали несколько различающейся температурой плавления: 45.8 °С для изомера с меньшим временем удерживания, 45.1 °С для изомера с большим временем удерживания (Т. пл. аналогичного немодифицированного комплекса составляла 45.1 °С). На основе этих данных можно предположить, что ФГ-группа в указанных условиях незначительно влияет на стабильность дуплексов, несмотря на достаточно существенный объём заместителя возле атома фосфора. Р-алкилфосфонаты, описанные в предыдущем разделе, проявляли гораздо большее различие в стабильности комплексов.

Также в работе [51] с помощью методов ЯМР, спектроскопии кругового дихроизма и молекулярной динамики были тщательно исследованы структурные характеристики дезоксириботринуклеотида d(TCA), содержащего только одну ФГ-группу. Спектры КД нативного и ФГ-тринуклеотидов практически идентичны при температуре 25 °С и 95 °С (рисунок 1.19), что указывает на то,

что введение ФГ-группы практически не влияет на пространственную структуру тринуклеотида.

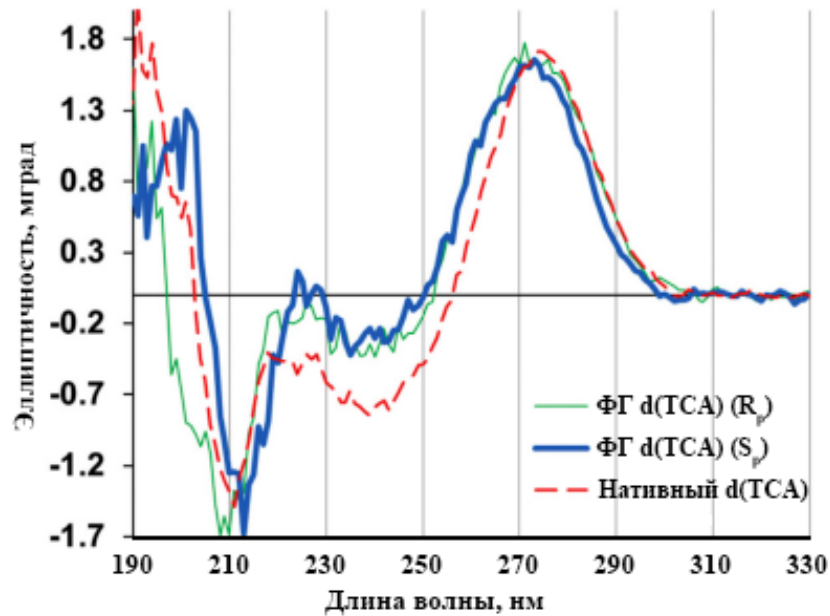


Рисунок 1.19 — Спектры кругового дихроизма, полученные при 25 °С для нативного и ФГ-тринуклеотида d(TCA).

Изображение адаптировано из работы [51].

В дальнейшем был проведён анализ температурной серии КД спектров для ДНК-дуплексов, образованных с участием либо нативного декануклеотида, либо его полностью модифицированного ФГ-аналога, обладающего электронейтральным рибозофосфатным остовом. В обоих случаях спектры КД, зарегистрированные при низкой температуре, имели аналогичный профиль, характерный для В-формы двойной спирали ДНК [52]. Также для обоих вариантов комплекса в спектре наблюдали точки изоэллиптичности, в которых значения эллиптичности совпадают для всех рассматриваемых температур (рисунок 1.20). Наличие таких особых точек свидетельствует о том, что процесс образования комплементарных комплексов может быть описан в рамках «модели двух состояний». Таким образом, даже исчерпывающая модификация рибозофосфатного остова олигонуклеотида фосфорилгуанидиновыми группами не приводит к значимым изменениям процесса формирования ДНК-дуплексов и не искажает их структурную организацию [53; 54].

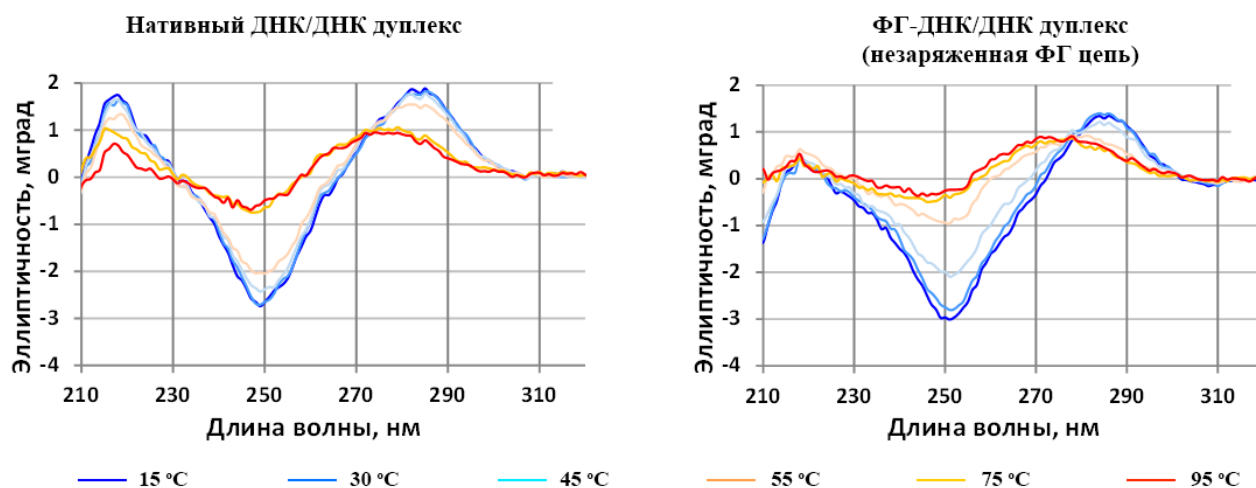


Рисунок 1.20 — Серия спектров КД для комплементарных ДНК-дуплексов, содержащих нативный или ФГ-декануклеотид.

Изображение адаптировано из работы [53].

Также в работе [51] показано, что ФГ-тринуклеотид $d(TCA)$ не подвергается расщеплению фосфодиэстеразой змеиного яда в течение 7 суток, в то время как немодифицированный тринуклеотид деградирует в течение получаса. Помимо устойчивости к действию фосфодиэстеразы змеиного яда, ФГ-олигонуклеотиды были испытаны как субстраты для ряда других ферментов. Было показано, что ФГ-олигонуклеотиды являются нереакционноспособным субстратом для АП-эндонуклеазы АРЕ1, что может быть использовано в исследованиях структурно-функциональных свойств фермента или в разработке ингибиторов [55]. Также ФГ-олигонуклеотиды, согласно устному сообщению к.ф.-м.н. Ломзова А.А., способны выступать в роли ферментов для ДНК-зависимой ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, что несвойственно для других незаряженных аналогов НК.

Поскольку введение ФГ-группы производится без использования специальных нуклеозидных мономеров, а за счёт изменения только условий окисления межнуклеотидного фосфиттриэфира, легко могут быть получены различные химерные конструкции, содержащие незаряженные фосфорилгуанидиновые остатки в заранее заданных позициях. Также возможно комбинировать ФГ-модификации с использованием функциональных нуклеозидных и ненуклеозидных мономеров, значительно расширяя спектр возможных свойств ФГО. Так, например, в работе [56] исследовали влияние липофильных заместителей на проникновение олигонуклеотидов во внутриклеточное пространство. Рассматриваемые олигонуклеотиды содержали сразу несколько функциональных

заместителей: 5'-концевые остатки додециламина – для усиления гидрофобных взаимодействий с клеточной мембраной, 3'-концевые ФГ-группы – для обеспечения стабильности олигонуклеотида к действию нуклеаз, и 5'-концевой остаток флуоресцеина – для обнаружения олигонуклеотидного материала по сигналу флуоресценции. Таким образом, варьируя тип используемых функциональных заместителей и их взаимное расположение вдоль рибозного остова можно создавать на основе ФГО множество различных по своим свойствам химерных конструкций, эффективных для решения конкретной молекулярно-биологической задачи, в том числе, и для исследования ферментативных процессов [57; 58].

* * *

В данном разделе были кратко рассмотрены методы химического синтеза олигонуклеотидов и современные подходы к созданию функциональных производных олигонуклеотидов, обладающих незаряженным остовом. Наиболее яркими представителями незаряженных аналогов НК являются пептидо-нуклеиновые кислоты, морфолиновые олигонуклеотиды, Р-алкилфосфонатные олигонуклеотиды и фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды. Для каждого из этих типов производных рассмотрены оригинальные синтетические методики их получения, проанализирована трудоёмкость и гибкость этих методик. На основе этих данных можно утверждать, что наиболее простым в получении, доступным вариантом незаряженных аналогов ОН являются фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды, так как методика их синтеза подразумевает изменение лишь условий окисления межнуклеотидного фосфита и в остальном никак не отличается от «стандартного» фосфитамидного протокола синтеза. Это позволяет легко получать множество химерных вариантов ФГО, в том числе содержащих другие варианты модификации. В свою очередь, для получения других незаряженных аналогов ОН – пептидо-нуклеиновых кислот, морфолиновых и Р-алкилфосфонатных олигонуклеотидов – необходимо задействовать специальные методы синтеза и уникальные химические реагенты.

Так, пептидо-нуклеиновые кислоты, обладающие уникальным средством к комплементарным НК-мишеням и стабильностью к действию нуклеаз, являются самым трудным к получению классом незаряженных НК. Синтез их остова, подобно полипептидному, требует специфических химических реагентов, несовместимых с «классическим» методом синтеза олигонуклеотидов – фосфитамидным методом. Поэтому вплоть до настоящего времени не предложены удобные автоматизированные способы создания переменных химерных конструкций, которые позволили бы сгладить некоторые недостатки ПНК, например, крайне ограниченную растворимость в водных растворах и склонность к агрегации.

Морфолиновые олигонуклеотиды первоначально также требовали специфического подхода к синтезу, поскольку структура мономерного звена, предложенная в оригинальных работах Саммертона, подразумевала наращивание олигонуклеотидной цепи в направлении 5'-3', в то время как фосфитамидный метод предполагает синтез в обратном направлении. Однако на сегодняшний

день можно обнаружить работы, которые предлагают альтернативную структуру мономера, пригодную к использованию в рамках модифицированного фосфитамидного протокола. Это позволило получить химерные нуклеотидные последовательности, обладающие частично незаряженным смешанным остовом. Создание таких конструкций, вероятно, также будет способствовать лучшей растворимости МО в водных растворах и, возможно, позволит использовать МО в качестве субстратов для ферментов, процессирующих нуклеиновые кислоты.

Р-алкилфосфонатные производные НК проще с точки зрения их получения: необходимо использовать специальные Р-алкилзамещённые фосфитамидные мономеры, но в целом методология синтеза полностью совпадает с фосфитамидным методом. Однако важной особенностью Р-алкилфосфонатов является хиральность атомов фосфора в составе модифицированных остатков. Возникающие диастереомерные формы олигонуклеотида существенно различаются по своим свойствам – в частности, наличие S_p центров значительно дестабилизирует комплементарные комплексы. Таким образом, для того, чтобы использовать Р-алкилфосфонаты для комплементарного связывания НК-мишеней необходимо синтезировать оптически чистые олигонуклеотидные препараты, что является трудоёмким и значительно ограничивает доступность Р-алкилфосфонатных аналогов ОН.

Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды также содержат оптический центр в составе ФГ-группы, однако согласно литературным данным обе диастереомерные формы ФГО образуют стабильные комплементарные комплексы: температуры плавления дуплексов ФГО практически совпадают с таковой для нативных комплексов. Благодаря этому возможно использовать ФГО как зонды для анализа НК, не выделяя оптически чистые формы. Также ФГО проявляют интересные субстратные свойства: с одной стороны, они устойчивы к действию некоторых нуклеаз, с другой стороны, они могут вступать в реакции, катализируемые ДНК-полимеразой и ДНК-лигазой. Комбинация этих характеристик в сочетании с простотой синтеза делает ФГ-олигонуклеотиды перспективным, гибким и доступным инструментом для широко спектра задач.

1.2 Возможности использования производных олигонуклеотидов для анализа нуклеиновых кислот

Анализ нуклеиновых кислот включает в себя спектр разнородных молекулярно-биологических задач, конечной целью которых может являться качественная детекция НК, количественное определение, установление нуклеотидной последовательности и/или пространственной структуры НК. В большинстве случаев такие задачи подразумевают под собой многостадийный процесс. К примеру, если рассмотреть секвенирование РНК в общем случае, не заостряя внимания на конкретных методиках и соответствующей специфике, можно выделить следующие стадии:

- синтез кДНК, амплификация при помощи ПЦР;
- секвенирование и реконструкция.

Точность и эффективность каждого из этапов подготовки образца («создания библиотеки») влияет на корректность получаемых в итоге данных о нуклеотидной последовательности, а также на трудоёмкость методики в целом. Для каждого из этапов существуют разные варианты реализации [59; 60], но практически любой из них задействует олигонуклеотидный инструментарий в том или ином качестве: как зонды для гибридизации, праймеры и адаптеры для амплификации НК. Соответственно, использование различных вариантов модифицированных олигонуклеотидов, в том числе химерных функциональных вариантов, может обеспечить упрощение и усовершенствование отдельных этапов обработки НК-содержащего материала и, как следствие, способствовать оптимизации методов анализа нуклеиновых кислот в целом.

Первый из этапов – синтез кДНК – как правило состоит из следующих этапов:

- выделение РНК из клеточного экстракта;
- лигирование адаптерных участков;
- синтез кДНК в реакции обратной транскрипции.

Реакция обратной транскрипции может включать в себя этап лигирования адаптеров [61–63]. Далее в данном разделе обзора будут рассмотрены варианты применения модифицированных производных олигонуклеотидов для выделения НК и синтеза кДНК, в том числе проанализированы возможные преимущества незаряженных аналогов НК.

1.2.1 Использование модифицированных олигонуклеотидов для деплеции нуклеиновых кислот

Первоочередной задачей при анализе природных нуклеиновых кислот является их выделение и очистка. В случае исследования РНК-транскриптов этот этап является особенно критичным, поскольку целевые низкокопийные РНК необходимо отделить от превалирующих рРНК и тРНК. Существующие для этого подходы можно в целом разделить на две группы:

- подходы, основанные на ферментативном расщеплении «лишних» НК под действием нуклеаз;
- подходы, основанные на гибридизации олигонуклеотидного зонда с целевой НК.

Один из возможных подходов к очистке НК при помощи ферментативного гидролиза основан на различии в эффективности гибридизации НК в растворе: в результате термической денатурации ДНК с последующим постепенным охлаждением быстрее формируются дуплексы тех ДНК, которые более широко представлены в растворе [64]. Образующиеся дуплексы обрабатывают термостабильной дуплекс-специфичной нуклеазой камчатского краба, таким образом снижая концентрацию нецелевых ДНК. Такой подход не позволяет получить целевую НК в индивидуальном виде, но приводит к выравниванию представленности различных НК в исследуемом растворе.

Ещё одним подходом, использующим ферментативный гидролиз нецелевых РНК, является протокол «NEBNext»: он подразумевает образование гибридного комплекса рРНК со специфичным комплементарным ДНК-зондом (рисунок 1.21). При обработке РНКазой H происходит расщепление РНК именно в составе комплементарных РНК/ДНК комплексов, не затрагивая одноцепочечные РНК. Внесённые ДНК-зонды также гидролизуют при помощи ДНКазы I [65].

Поскольку в данном подходе критичным является формирование РНК/ДНК комплекса, использование модифицированных зондов, обладающих повышенным сродством к комплементарным НК, может способствовать более эффективной очистке целевой нуклеотидной последовательности. Также может быть перспективным использование зондов, способных к формированию комплементарных комплексов в растворах с пониженной ионной силой, поскольку



Рисунок 1.21 — Схема выделения целевой РНК с помощью ферментативного расщепления рРНК.

в таких условиях могут быть дестабилизированы внутримолекулярные вторичные структуры РНК. Такими зондами могут выступать незаряженные аналоги ДНК, однако также необходимо, чтобы используемый модифицированный зонд не ингибировал расщепление РНК/ДНК комплекса РНКазой Н. Как правило, полностью незаряженные аналоги олигонуклеотидов блокируют активность РНКазы Н [35], однако химерные олигонуклеотидные зонды могут формировать гибридные дуплексы, способные выступать реакционноспособным субстратом для РНКазы Н [66].

Вторая группа подходов к очистке НК основана на образовании дуплекса исследуемой НК с зондом, комплементарным специфическому участку этой НК. К ним относится так называемое поли(А)-обогащение – выделение мРНК эукариот, содержащих консервативный участок, поли(А)-тракт, на 3'-конце последовательности. Для этого в качестве зонда используют dT₂₅, иммобилизованный на магнитных частицах [67]. Формирующийся комплементарный комплекс мРНК с зондом отделяют при помощи магнита, а супернатант, содержащий негибридизованные РНК, удаляют. Такой подход, тем не менее, не позволяет выделить прокариотические РНК или различные некодирующие РНК ввиду отсутствия поли(А)-тракта.

Другой подход подразумевает очистку целевых НК посредством удаления других НК из смеси. В случае РНК, как упоминалось ранее, осуществляют РНК-деплецию – удаление различных рРНК и тРНК, составляющих не менее 85% всех клеточных РНК [68]. Для этого как правило также используют специфические олигонуклеотидные зонды и иммобилизацию на поверхности магнитных частиц. К примеру, протоколы «RiboZero» и «RiboMinus» позволяют удалить цитоплазматическую и, в некоторых случаях, митохондриальную рРНК различных организмов (бактерий, дрожжей, человека и др.) за счёт образования комплекса с биотинилированным олигонуклеотидным зондом. После гибридизации комплекса рРНК-зонд раствор переносят к суспензии маг-

нитных шариков, покрытых стрептавидином. За счёт образования прочного биотин-стрептавидинового комплекса рРНК оказываются зафиксированы на поверхности частиц, и супернатант, содержащий целевые последовательности РНК, отделяют от частиц при помощи магнита. Таким образом возможно удалить до 99% рРНК [69], хотя результаты деплеции в значительной степени зависят не только от выбранного протокола деплеции, но и от типа рассматриваемых клеток и метода извлечения РНК-экстракта [70–72].

Примечательно, что в случае протоколов «RiboMinus» олигонуклеотидные зонды, согласно информации производителей, содержат модифицированные нуклеотидные остатки – так называемые «замкнутые» нуклеотиды. Известно, что введение такого типа модификаций приводит к стабилизации комплементарных НК-комплексов [3]. Вероятно, что эти протоколы основаны именно на различии в температуре плавления совершенного и несовершенного комплексов с участием «замкнутых» олигонуклеотидов. Точное количество и расположение модифицированных звеньев в составе зонда, тем не менее, авторами протоколов не раскрывается.

Использование незаряженных производных олигонуклеотидов может быть перспективным в контексте РНК-деплеции, так как они также характеризуются повышенным сродством к комплементарным НК, в том числе в растворах с пониженной ионной силой [73], и высокой специфичностью распознавания комплементарной последовательности [74]. В работе [75] рассматривают подход к селективной очистке РНК с помощью зондов на основе морфолиновых олигонуклеотидов (МО). Показано, что при помощи биотинилированного МО-зонда возможно удалить до 80% поли(гА) из раствора, содержащего 1 мМ EDTA, pH 8.0 (рисунок 1.22).

Также видно, что МО-зонд характеризуется меньшей скоростью гибридизации по сравнению с нативным зондом. Предположительно, это может быть связано с каким-либо взаимодействием МО и поверхности используемых частиц в растворе с низкой ионной силой.

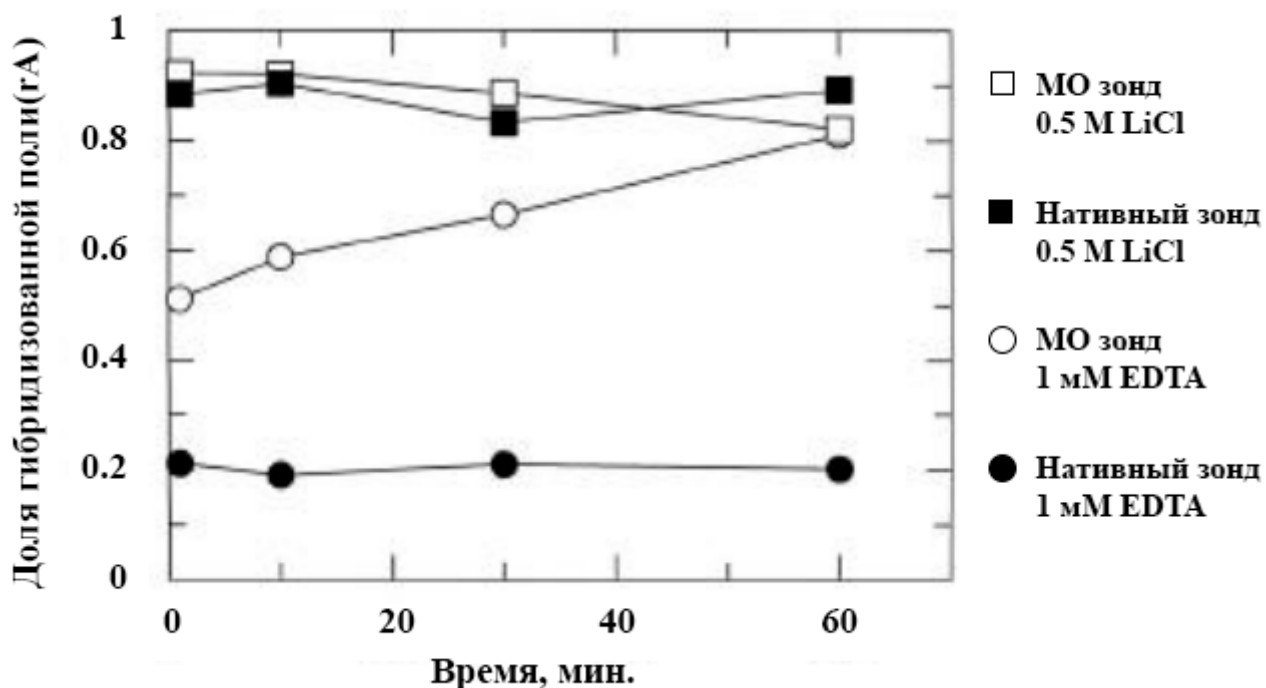


Рисунок 1.22 — Эффективность удаления поли(гА) из раствора при помощи нативного или МО зонда в условиях высокой и низкой ионной силы.

Изображение адаптировано из работы [1.22](#).

Таким образом, существующие методы очистки и детекции НК нуждаются в олигонуклеотидном инструментарии, способствующим высокоспецифичному и эффективному связыванию комплементарных мишеней. Использование незаряженных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов может быть перспективным подходом к усовершенствованию этих методов, поскольку позволяет расширить диапазон буферных условий для комплексообразования и может приводить к дестабилизации внутримолекулярных структур НК, тем самым повышая доступность различных консервативных участков в их нуклеотидной последовательности. Использование химерных вариантов олигонуклеотидов может позволить осуществить не только специфическую гибридизацию, но и протекание ферментативных реакций с участием комплекса зонд-мишень.

1.2.2 Использование модифицированных олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции

Для синтеза кДНК осуществляют реакцию обратной транскрипции, катализируемую РНК-зависимыми ДНК-полимеразами, или же ревертазами. Ревертазы могут обладать рядом ферментативных активностей, среди которых можно выделить:

- **полимеразная активность** – ДНК- или РНК-зависимый синтез элементарной ДНК [76; 77], в том числе синтез с вытеснением цепи [78; 79];

К особенностям полимеразной активности можно отнести различные явления переноса цепи, в том числе перенос праймера (внутри- или межмолекулярный, т.е. со сменой матричной цепи), а также проскальзывания («slippage») и другие нуклеотидные перестройки («frameshifting», «rearrangement») [80; 81].

- **активность РНКазы Н** – гидролиз РНК в составе гибридного РНК/ДНК дуплекса [82; 83];

Также известна терминалтрансферазная активность – безматричный синтез нескольких «дополнительных» нуклеотидных звеньев на 3'-конце ДНК в составе дуплекса. Ревертазы могут обладать такой активностью [84–86], хотя её значение для вирусной репликации не совсем ясно: возможно, одноцепочечные нависающие участки, возникающие в результате безматричного синтеза, благоприятствуют переносу цепи.

Направленное изменение структуры и свойств ревертаз является важным подходом для совершенствования реакции обратной транскрипции [87; 88]. Не менее значимым подходом к оптимизации реакции ОТ является использование модифицированных олигонуклеотидов. Например, в работе [89] в качестве праймеров в реакции ОТ использовали химерные олигонуклеотиды, содержащие так называемые «замкнутые» нуклеотидные звенья (рисунок 1.23, А). В данной работе сравнивали эффективность гибридизации нативного и модифицированного олигонуклеотидов и комплементарных структурированных РНК *Escherichia coli*, содержащих GC-богатые шпильки вблизи 3'-конца последовательности. Благодаря повышенной гибридизационной способности «замкнутых» олигонуклеотидов [90], химерный ОН, содержащий 5 модифици-

рованных остатков рибозы, образует комплементарный комплекс с участками РНК, формирующими шпильку, в то время как нативный аналог, даже при 10-кратном молярном избытке, не способен сформировать комплементарный комплекс с этими участками РНК (рисунок 1.23, Б), поскольку термостабильность внутримолекулярного РНК-комплекса превосходит таковую для межмолекулярного комплекса РНК и нативного олигодезоксирибонуклеотида. Также в работе [89] провели элонгацию химерного ДНК-праймера, содержащего 5 «замкнутых» нуклеотидных звеньев, с помощью ревертазы «SuperScript III». В работе [91] с использованием ревертаз осуществили встраивание «замкнутого» аналога ТТР в ДНК-праймер.

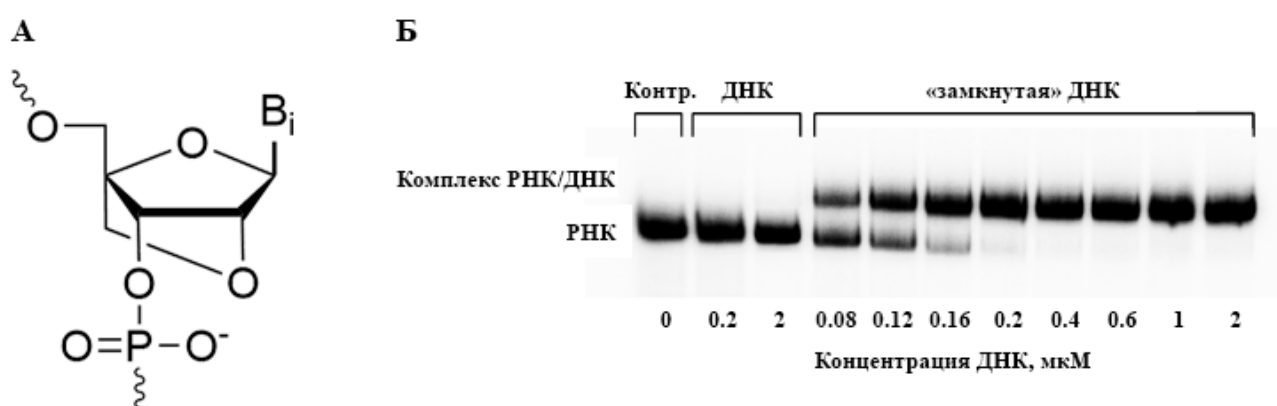
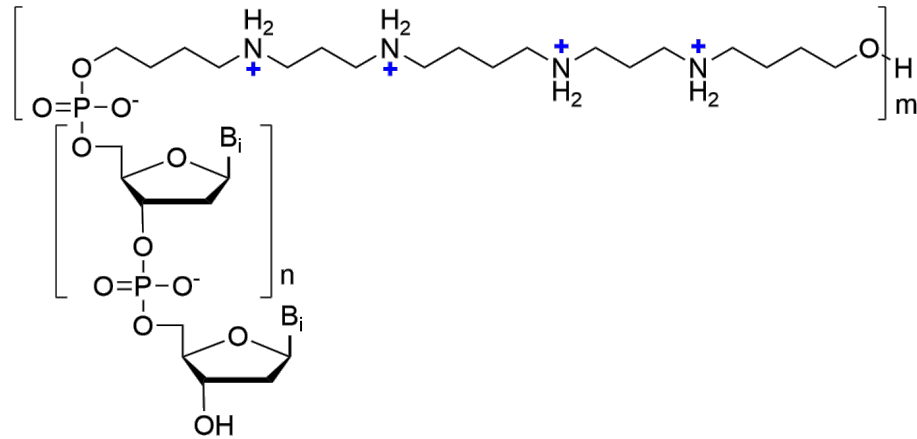


Рисунок 1.23 — Структура «замкнутого» нуклеотидного звена (А), сравнение эффективности гибридизации нативного и «замкнутого» олигонуклеотида с структурированной РНК-мишенью методом нативного гель-электрофореза (Б).

Изображение (Б) адаптировано из работы [89].

Ещё одним примером модифицированных ОН, используемых для оптимизации реакции ОТ, являются так называемые «Zip Nucleic Acid» (ZNA): аналоги олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие на 5'-конце последовательности поликатионные ненуклеотидные заместители на основе алифатического полиамина – спермина (рисунок 1.24). Наличие поликатионного заместителя компенсирует электростатическое отталкивание НК, что приводит к увеличению термической стабильности комплементарных комплексов [92]. В работе [93] проведено сравнение эффективности ОТ-ПЦР для трёх типов праймера: нативного, «замкнутого» и ZNA. Показано, что в стандартных буферных условиях при использовании ZNA-праймера образуются неспецифические продукты амплификации. Для решения этой проблемы авторы предложили умеренно понизить концентрацию $MgCl_2$ в буферном растворе (с 4 до 1.5 мМ) для того,

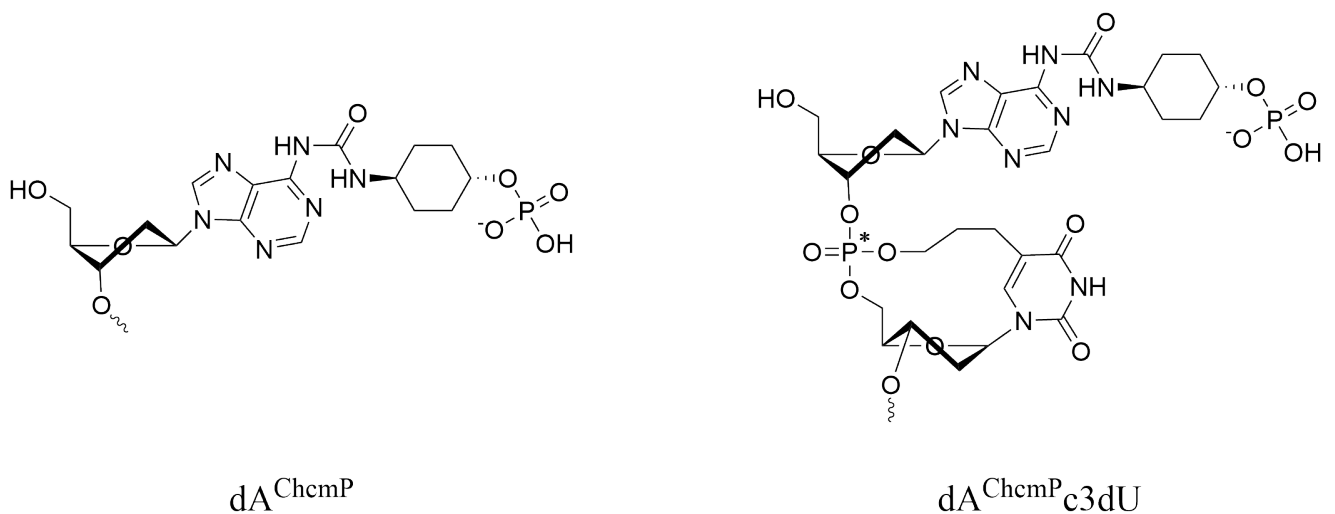
чтобы дестабилизировать неспецифические комплексы НК-ZNA, но сохранить каталитическую активность используемых ферментов. В таких условиях была исследована эффективность реакции ОТ и ПЦР-амплификации с участием ZNA-праймеров. Показано, что ZNA могут быть использованы для быстрого и эффективного количественного анализа геномных РНК методом ОТ-ПЦР [93; 94].



ZNA

Рисунок 1.24 — Структура «Zip Nucleic Acid» (ZNA).

В работе [95] использовали в качестве праймеров в реакции ОТ модифицированные олигонуклеотиды, на 5'-конце которых находится объёмный конформационно жёсткий заместитель на основе аденозина, содержащего остаток циклогексилфосфата (рисунок 1.25).



dA^{ChemP}

$dA^{ChemP}c3dU$

Рисунок 1.25 — Структура dA^{ChemP} и $dA^{ChemP}c3dU$. [95]

Показано, что декануклеотид, содержащий dA^{ChemP} , образует наиболее стабильные комплексы с 9-звенной комплементарной РНК-мишенью, имитиру-

ющей 3'-концевой участок miR-9. В случае уменьшения или увеличения длины РНК на один нуклеотид, температура плавления комплекса уменьшается на 9 или 5 °С соответственно. Температура плавления комплекса с 14-звенной РНК, имитирующей пре-miR-9, была на 13 °С меньше, чем в случае целевой 9-звенной РНК. Нативный декануклеотид, в свою очередь, образовывал наиболее стабильный дуплекс с 10-звенной РНК, которая не является целевой мишенью.

Предположительно, дестабилизация комплексов с более длинными РНК происходит за счёт электростатического отталкивания между dA^{ChcmP} и РНК, а также за счёт стерического напряжения (рисунок 1.26). В данной работе [95] также продемонстрировано использование праймера, модифицированного dA^{ChcmP} , для селективной и эффективной амплификации целевого участка миРНК.

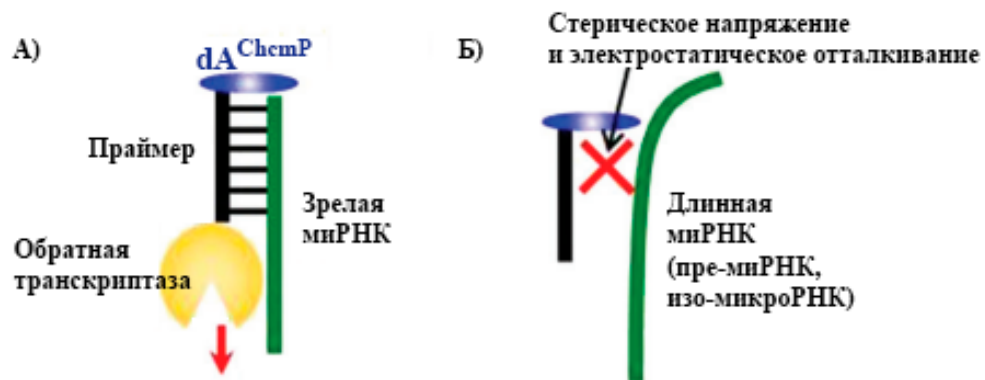


Рисунок 1.26 — Распознавание целевой миРНК с помощью праймера, содержащего dA^{ChcmP} .

Изображение адаптировано из работы [95].

В работе [96] рассматривают реакцию обратной транскрипции с участием ревертазы вируса иммунодефицита человека HIV-1 и олигонуклеотида, содержащего объёмный заместитель – 2'-O- β -D-рибофуранозиладенозин – внутри нуклеотидной последовательности (рисунок 1.27). В работе рассмотрены 5 вариантов расположения данной модификации: в -13, -6, -5, -4, -3 позициях относительно 3'-гидроксигруппы праймера. Показано, что по мере сближения модифицированного остатка 3'-гидроксигруппы праймера уменьшается значение K_m , таким образом, эффективность образования фермент-субстратного комплекса снижается. Примечательно, что в случае нахождения модификации в -4 позиции элонгация праймера не происходила, то есть данный вариант модифицированного олигонуклеотида выступал в роли ингибитора реакции обратной транскрипции.

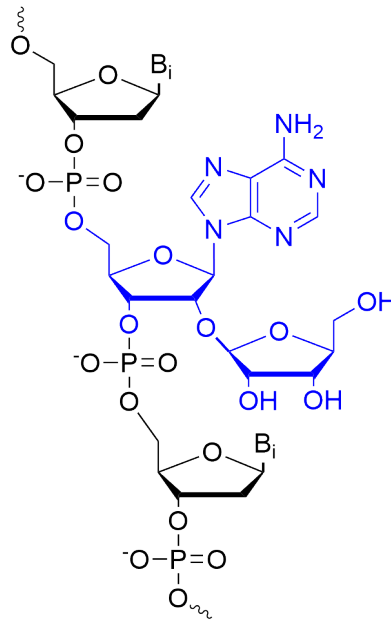


Рисунок 1.27 — Структура нуклеотидной последовательности, содержащей 2'-О-β-D-рибофуранозиладенозин. B_i – азотистое основание.

Авторы [96; 97], основываясь на данных компьютерного моделирования и рентгенографии, связывают ингибирование реакции ОТ со стерическим напряжением, возникающим между остатком 2'-О-β-D-рибофуранозиладенозина в -4 позиции и аминокислотными остатками Lys263 и Trp266. Данные аминокислоты расположены в α-спирали Н, которая является структурным элементом фермента, контактирующим с малой бороздкой ДНК-дуплекса [98]. Таким образом, критическим параметром, определяющим возможность использования модифицированных производных олигонуклеотидов в качестве праймеров в реакции обратной транскрипции, является не только наличие и вид модификаций, но и их расположение внутри фермент-субстратного комплекса.

Также на основе терминалтрансферазной активности ревертаз разрабатывают подходы к более совершенной амплификации полноразмерных кДНК и более простому и эффективному лигированию «якорных» последовательностей (адаптерных участков) для секвенирования [61–63]. Схема синтеза кДНК, содержащей заранее заданный адаптерный участок, представлена на рисунке 1.28. Она подразумевает образование одноцепочечного нависающего участка d(CCC) на 3'-конце праймера вследствие терминалтрансферазной активности. Затем в присутствии «дополнительного» олигонуклеотида-адаптера, содержащего 3'-концевой фрагмент r(GGG), происходит смена матричной цепи, благодаря чему синтез кДНК продолжается по матрице ДНК.

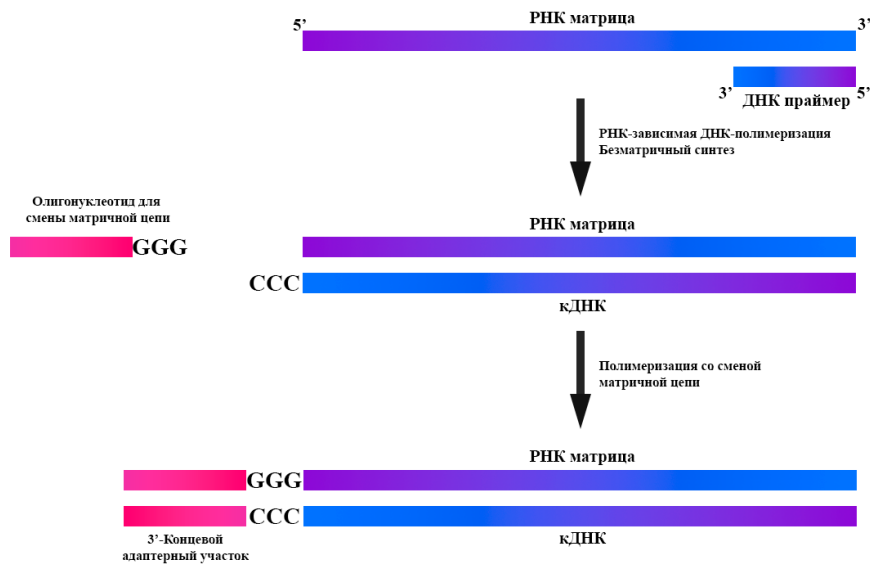


Рисунок 1.28 — Схема синтеза кДНК со сменой матричной цепи для «лигирования» адаптерной последовательности.

Тем не менее, в ряде работ [99; 100] отмечают, что в случае низкого содержания НК-субстрата эффективность синтеза со сменой матричной цепи может быть низкой. Кроме этого, возможно многократное «лигирование» адаптерной последовательности вследствие повторения безматричного синтеза dC-нависания и отжига олигонуклеотида-адаптера (рисунок 1.29).

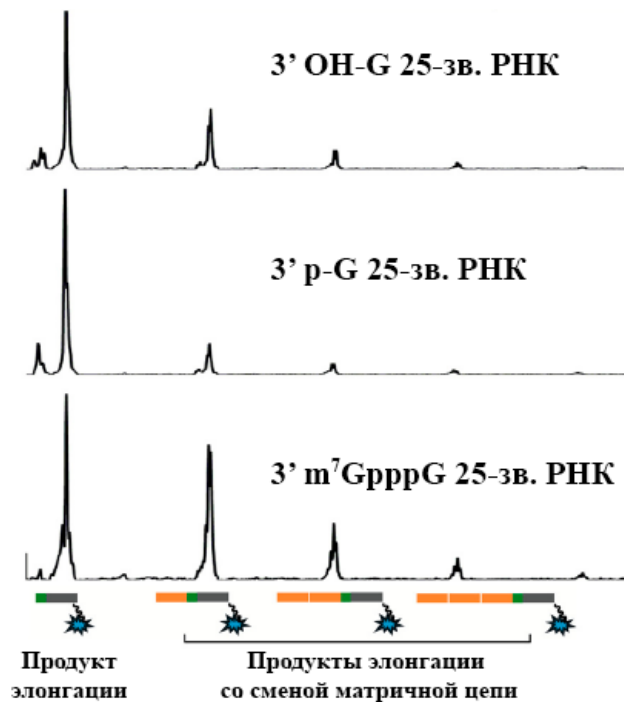


Рисунок 1.29 — Результат капиллярного электрофореза продуктов синтеза кДНК, содержащих адаптерную последовательность.

Изображение адаптировано из работы [100].

Одним из возможных вариантов решения этих проблем может быть использование модифицированных ОН сложной архитектуры, способствующей, с одной стороны, более эффективному отжигу адаптера на одноцепочечный фрагмент d(CCC), образующийся в результате безматричного синтеза, и, с другой стороны, блокирующей возможность повторного синтеза одноцепочечного нависания и образования «конкатамерных» повторов. В работе [101] для этого использовали олигонуклеотид, содержащий на 3'-конце тринуклеотид rG_3 и на 5'-конце – три звена iso-dG , структурного изомера гуанозина (рисунок 1.30). После смены матричной цепи на такой олигонуклеотид, ревертаза продолжала полимеризацию, но, по достижении модифицированного «изо-нуклеотидного» участка, синтез прекращался, что делало невозможным повторное возникновение dC-нависания.

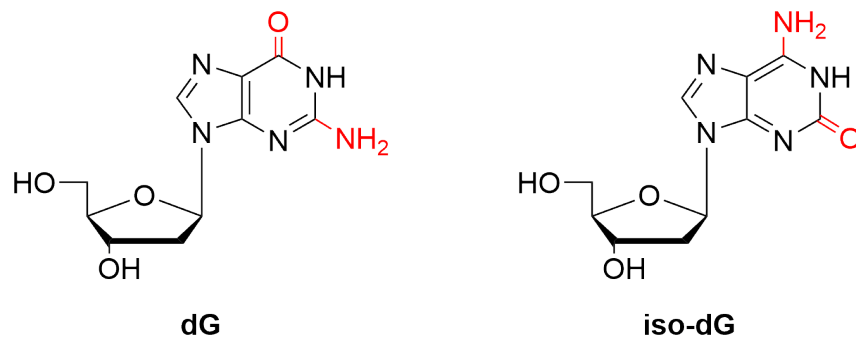


Рисунок 1.30 — Структурные формулы дезоксирибогуанозина dG и его структурного изомера iso-dG.

Необходимо отметить, что в целом работы, задействующие модифицированные ОН для оптимизации реакции ОТ, достаточно немногочисленны, а примеров использования незаряженных аналогов ОН для этой цели в принципе не удалось обнаружить в литературе. Вероятно, это можно объяснить тем, что, с одной стороны, незаряженные аналоги, как правило, неспособны участвовать в ферментативных превращениях, и, с другой стороны, тем, что получение химерных частично заряженных вариантов остова часто является нетривиальной задачей. Тем не менее, незаряженные производные ОН могут быть перспективной платформой для конструирования праймеров и адаптеров сложной архитектуры, влияющих на стабильность НК-субстрата и эффективность действия той или иной ферментативной активности. К примеру, способность незаряженных НК образовывать комплементарные комплексы в низкосолевых условиях может расширить диапазон буферных условий проведения реакции ОТ и, возможно, повысить процессивность синтеза кДНК

за счёт дестабилизации внутренних вторичных структур РНК-матрицы. Также не исключено, что при помощи незаряженных аналогов ON возможно «блокировать» нежелательные варианты ферментативной активности (например, терминалтрансферазную активность, аналогично вышеупомянутой работе с iso-dG [101]) и влиять на частоту нуклеотидных перестроек, характерных для рассматриваемого НК-субстрата. Таким образом, можно заключить, что синтез функциональных олигонуклеотидных конструкций, содержащих, в частности, незаряженные фрагменты остова, а также исследование их субстратных свойств является важной задачей, открывающей новые перспективы для оптимизации методов анализа нуклеиновых кислот.

2. Материалы и методы

В работе были использованы ацетонитрил, триэтиламин («Fluka», Швейцария), мочеви́на, акриламид, уксусная кислота, персульфат аммония, ацетон, додецилсульфат натрия («Диам», Россия), N,N'-метиленабисакриламид, бромфеноловый синий, борная кислота, ЭДТА, N,N-диметилформамид, ксиленианол, тетраметилэтилендиамин, метиленовый синий («Sigma», США). Реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного и импортного производства. Абсолютизирование растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием их над молекулярными ситами или гидридом кальция.

2.1 Синтез олигонуклеотидов

Синтез олигонуклеотидов (ON) проводили на автоматическом синтезаторе ASM800 («Биоссет», Россия) согласно стандартному протоколу 2-цианэтильного фосфитамидного метода, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и ненуклеотидные вставки (GlenResearch, ChemGenes, США). В качестве полимерного носителя использовали стекло с контролируемым размером пор (CPG), в т.ч. биотин-содержащее пористое стекло («Biotin CPG», Primetech, Республика Беларусь). Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие фосфорилгуанидиновые звенья, синтезировали, используя протокол, описанный ранее в работах [9; 10].

2.2 Деблокирование олигонуклеотидов

Снятие щелочелавильных защитных групп и удаление с полимерного носителя нативных и ФГ-олигонуклеотидов проводили, выдерживая полимер в смеси водных растворов аммиака и метиламина (1:1 V/V) в течение 1 часа при

65 °С. При наличии флуоресцеина в составе ОН деблокирование проводили в растворе аммиака при 25 °С в течение двух суток.

Биотин-содержащие 26-звенные олигонуклеотиды удаляли с полимерного носителя, обрабатывая полимер концентрированным водным раствором аммиака в течение ночи при нагревании до 56 °С. Для модельных биотиновых тритимидилатов обработку проводили в течение 2 ч при нагревании до 56 °С. Гетеротринуклеотиды ($C^{\circ}A^*T^{\circ}-[Bio]$ и $C^{\circ}A^{\circ}T^*-[Bio]$, где «*» – ФГ-группа, « \circ » – нативный фосфат) обрабатывали в течение 2 ч при 56 °С, затем (если необходимо) выдерживали в концентрированном водном аммиаке в течение ночи. В независимом эксперименте тринуклеотид $C^{\circ}A^{\circ}T^*-[Bio]$ обрабатывали сначала безводным раствором 50% триэтиламина в ацетонитриле (1 ч, 56 °С), затем удаляли раствор триэтиламина и обрабатывали тринуклеотид водным раствором аммиака (2 ч, 56 °С).

2.3 Хроматография

Препаративное выделение (DMTr-ON) 26-звенных биотиновых олигонуклеотидов осуществляли методом ОФ-ВЭЖХ на хроматографе «Agilent 1200 series» («Agilent», США). Использовали колонку (4.6 x 150 мм) с сорбентом «Eclipse XDB-C18» (5 мкм) («Agilent», США), олигонуклеотиды элюировали в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0-90%) в 0.02 М растворе триэтиламмоний ацетата за 40 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

Для анализа реакционных смесей ФГ-олигонуклеотидов и биотиновых гетеротринуклеотидов проводили аналитическую ОФХ на хроматографе «Милхром А02» («Эконова», Россия) с использованием колонки (2 x 75 мм) с «ProntoSIL-120-5-C18» («Эконова», Россия), элюировали в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0-55%) в 0.02 М водном растворе триэтиламмоний ацетата за 15 минут, скорость потока 150 мкл/мин, температура термостата 35 °С. Выход хроматографических пиков детектировали по интенсивности оптического поглощения на длине волны 260, 280, 300 нм.

2.4 Масс-спектрометрия

Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии методом электро-спрей ионизации на приборе «Agilent G6410A LCMS/MS» (США). При подготовке образцов для масс-анализа олигонуклеотиды растворяли в 20 мМ триэтиламмоний ацетате в 60% водном ацетонитриле (до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл). Анализ проводили с использованием 80% водного ацетонитрила в качестве элюента при скорости потока 0.1 мл/мин в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Для анализа электро-нейтральных фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов образец растворяли в 20 мМ муравьиной кислоте в 60% водном ацетонитриле (до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл), анализ проводили в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

2.5 Спектрофотометрия

Регистрацию спектров оптического поглощения водных растворов олигонуклеотидов проводили на спектрофотометре UV-2100 («Shimadzu», Япония) в диапазоне длин волн 200-400 нм при комнатной температуре в кювете объемом 1 мл (длина оптического пути – 1 см). Коэффициент молярного поглощения нативного олигонуклеотида определяли как сумму значений коэффициентов молярного поглощения нуклеотидов, входящих в состав последовательности [102]. Коэффициенты молярного поглощения на 260 нм считали независимыми от наличия ДМГ в составе олигонуклеотида.

2.6 Термическая денатурация ДНК-дуплексов

Термическую денатурацию олигонуклеотидных дуплексов проводили на спектрофотометре Cary 300 Biomelt («Varian», Австралия), оснащённом тер-

морегулируемой шестикюветной приставкой. Термическую стабильность всех комплексов определяли в водных растворах одного из следующих составов:

- деионизованная (18 mQ) H₂O
- 10 mM какодилат натрия (CH₃)₂AsO₂Na (сокр. «CacNa»), pH 7.4
- 10 mM CacNa, 100 mM NaCl
- 10 mM CacNa, 1 M NaCl
- 10 mM CacNa, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂.

Компоненты дуплексов в эквимольном количестве помещали в буферный раствор (итоговая концентрация дуплекса – 2.0×10^{-5} M), после чего осуществляли два раунда «нагрев-охлаждение» в диапазоне от 5 до 95 °C со скоростью изменения температуры 0.5 °C/мин. Оптическое поглощение растворов регистрировали на длинах волн: 260, 270 и 300 нм. Температуру плавления дуплекса определяли как температуру, соответствующую максимуму первой производной зависимости оптической плотности изучаемого раствора от температуры [54]. Полученные данные усредняли, величина погрешности не превышала 0.3 °C.

2.7 Реакции обратной транскрипции

Ферментативное удлинение олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов в реакции ОТ проводили с использованием рекомбинантного фермента – обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей MMLV H- («СибЭнзим», Россия). В качестве буферного раствора использовали следующие составы: стандартный («St» – 30 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5 mM дитиотреит) и низкосолевого («Low» – 30 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM дитиотреит). Соотношение компонентов реакционной смеси ОТ приведено в таблице 2 (если не указано иное), суммарный объём смеси составил 10 мкл.

Реакцию ОТ проводили при 37 °C. Время реакции составило 1 час в случае 17-звенной РНК-матрицы и 3 часа в случае высокомолекулярной РНК-матрицы – фрагмента 18S рРНК человека, любезно предоставленного д.х.н. Малыгиным А.А. (ЛСФР ИХБФМ СО РАН). По окончании реакции фермент инактивировали термически, выдерживая реакционную смесь при 95 °C в течение 5 минут, или гидролизировали РНК-матрицу, добавляя к реакционной смеси избыток концентрированного водного аммиака и выдерживая 2 часа при

56 °С. Аммиак удаляли, упаривая растворы в вакуумном концентраторе до исчезновения запаха.

Реакции ОТ с использованием гомополимерных ДНК/РНК субстратов (dT₂₆/rA₆₀, dT₂₆/rA₂₆ и др.) проводили в условиях, аналогичных 2b. Об изменениях того или иного параметра реакции (изменения количества ревертазы, типа использованных трифосфатов, времени реакции) указано дополнительно.

Таблица 2 — Состав реакционных смесей для ОТ в случае короткой синтетической РНК-матрицы (а) и протяженного фрагмента рРНК (b).

а) 17-звенная РНК матрица		b) Фрагмент 18S рРНК	
компонент	количество	компонент	количество
ДНК	10 ⁻⁵ М	ДНК	10 ⁻⁶ М
РНК	10 ⁻⁵ М	РНК	10 ⁻⁶ М
MMLV Н-	200 ед. акт.	MMLV Н-	200 ед. акт.
dATP, dCTP, dGTP	300 мкМ каждого	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	300 мкМ каждого
dUTP ^{FAM}	50 мкМ	dUTP ^{FAM}	-
Буферный раствор	1x St	Буферный раствор	1x St или Low

2.8 Гель-электрофорез

Электрофоретический анализ олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов в денатурирующих условиях проводили в 15% ПААГ (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид (29:1), 8 М мочевины) в буфере TBE (89 мМ Tris-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂EDTA) при напряжении 50 В/см. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием геля реактивом «StainsAll». При наличии флуорофора в составе олигонуклеотидов проводили сканирование флуоресценции при помощи системы гель-документирования VersaDoc MP 4000 Molecular Imager System («Bio-Rad», США).

Для разделения протяжённых продуктов удлинения праймеров реакции ОТ использовали гель-электрофорез в 1.5% агарозном геле в буфере TBE в горизонтальной ячейке («Bio-Rad», США). Для оценки относительной электрофоретической подвижности образцов использовали двуцепочечный ДНК-маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder («ThermoScientific», Литва). Результаты электрофоретического разделения визуализировали, окрашивая гель бромистым этидием (0.0001% водный раствор) и сканируя сигнал флуоресценции, как описано выше. Относительное содержание основных продуктов удлинения праймеров вычисляли, анализируя сканированный сигнал флуоресценции соответствующих пятен при помощи программного обеспечения «GelPro Analyzer 4.0» («Media Cybernetics», США).

В случае электронейтральных ФГ-олигонуклеотидов электрофоретический анализ проводили в 15% ПААГ, содержащем SDS (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид (29:1), 0.05% SDS) в буфере TBE-SDS (89 мМ Tris-борат, pH 8.3, 2 мМ Na₂EDTA, 0.05% SDS) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов в гель использовали раствор, содержащий 0.025% ксиленцианол и 0.025% бромфеноловый синий, 0.05% SDS в 30% глицерине. О наличии 5 М мочевины в ПААГ и буфере для нанесения указано отдельно. Результаты электрофоретического разделения визуализировали, помещая гель на флуорофор-содержащую пластинку TLC Silica gel 60 F254 («Merck», США) и облучая УФ-светом (265 нм). Олигонуклеотидный материал (0.2 о.е.) проявляется в виде «теней» на фоне флуоресцирующей подложки.

2.9 Иммуобилизация олигонуклеотидов на поверхности

В случае полимерного носителя «Thymidine non-cleavable solid support» (ChemGenes, США) осуществляли синтез и деблокирование необходимого (нативного или ФГ-) олигонуклеотидного зонда согласно приёмам, описанным ранее. Получаемые зонды, связанные с поверхностью полистирольной частицы амидной связью, в процессе деблокирования не переходят в раствор. Для контроля качества получаемых ОН осуществляли аналогичный синтез на стандартном СРГ-носителе и анализировали реакционные смеси в 15% денатурирующем ПААГ.

В случае BrCN-активированной сефарозы «CNBr-Activated Sepharose 4B» (Cytiva, США) проводили подготовку поверхности и иммобилизацию ON, содержащих 5'-концевую аминогруппу, следующим образом:

- навеску сефарозы выдерживали в 200 мкл 1 мМ HCl, промывали порциями (5 * 400 мкл) холодного раствора 1 мМ HCl над фильтром, затем промывали 10 мМ раствором гидрокарбоната натрия, pH 8.0;
- к раствору олигонуклеотидного зонда (4 мкл $5.0 * 10^{-5}$ М раствора в 10 мМ NaHCO₃, pH 8.0) добавляли суспензию фазы (объем около 20 мкл, масса сефарозы 4-5 мг) и выдерживали в течение ночи при +4 °С или 3 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании;
- без дополнительных промывок добавляли NaOH до финальной концентрации 100 мМ и выдерживали 3 часа при комнатной температуре для кэпирования поверхности;
- NaOH и избыток ON удаляли, обильно промывая фазу водой над фильтром до нейтральной реакции раствора;

Полученные частицы сефарозы, содержащие иммобилизованный ON-зонд, ресуспендировали в 20 мкл деионизованной воды или буферного раствора («St»: 30 мМ Tris-HCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl). Добавляли водный раствор НК-мишени (0.5 мкл $4.0 * 10^{-5}$ М) и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Эффективность «выхватывания» комплементарной ФАМ-меченой НК-мишени оценивали, анализируя супернатанты в 15% денатурирующем ПААГ, как описано ранее.

Для проверки «зарядового состояния» используемых частиц BrCN-активированной сефарозы инкубировали их с 10^{-4} М раствором красителей – ксиленцианолового синего или метиленового синего – в 20% этиловом спирте в течение 2 часов при комнатной температуре. Сорбцию красителей отслеживали, сравнивая спектры оптического поглощения растворов над сефарозой и контрольных растворов.

3. Результаты и обсуждение

Основным предметом изучения в данной работе являются фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды – олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие модифицированные фосфатные группы, в которых по атому фосфора введён остаток N,N,N',N'-замещённого гуанидина (DMI на рисунке 3.1). Модификация фосфодиэфирной группы происходит в ходе автоматического синтеза ДНК с использованием коммерческих мономеров и полимерных носителей. В рамках данной работы будут рассмотрены олигодезоксирибонуклеотиды, различные по длине (от 6 до 26 звеньев), наличию ФГ-групп (частично или полностью незаряженные), наличию ненуклеотидных вставок (содержащие остатки биотина или флуоресцеина). Здесь и далее незаряженная ФГ-группа обозначена символом «*», а нативный фосфат – «°».

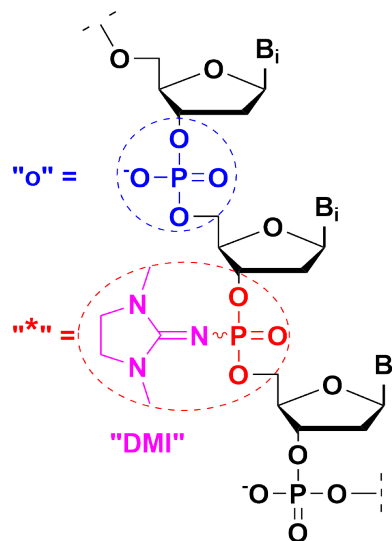


Рисунок 3.1 — Структуры нативной межнуклеотидной фосфатной группы («°») и модифицированной фосфорилгуанидиновой группы («*»), содержащей остаток N,N,N',N'-замещённого гуанидина («DMI»).

Работа условно разделена на четыре этапа, а именно на исследование:

- влияния ФГ-групп на физико-химические свойства ОН на примере ФГ-содержащих декануклеотидов и гомотимидилатных последовательностей;
- особенностей синтеза функциональных конструкций на основе ФГ-олигонуклеотидов на примере биотинилированных 26-звенных ОН и гетеро- и гомополимерных тринуклеотидов;

- субстратных свойств ФГ-олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции на примере ФГ-содержащих декануклеотидов и флуоресцентно меченых ОН;
- возможности ковалентной иммобилизации ФГ-олигонуклеотидов на поверхности BrCN-активированной сефарозы и «негидролизуемого» полистирольного носителя для ДНК-синтеза.

3.1 Влияние ФГ-групп на физико-химические свойства олигодезоксирибонуклеотидов

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 (таблица 3). В предложенных обозначениях «X» - общее название серии 10-звенных олигонуклеотидов, нижний индекс – порядковый номер с 5'-конца фосфодиэфирных групп, содержащих остаток ДМІ. Если структура содержит несколько ДМІ подряд, то через дефис указываются номера крайних модифицированных звеньев: таким образом, например, код $X_{1-3;7-9}$ подразумевает под собой структуру декануклеотида, в котором остатки замещенного гуанидина введены с 1 по 3 и с 7 по 9 фосфодиэфирные группы, а, соответственно, фосфатные остатки с 4 по 6 оставлены в нативном виде.

Все ОН были синтезированы, используя коммерчески доступные фосфитамидные мономеры с помощью автоматического ДНК-синтезатора, и подвергались унифицированной постсинтетической обработке. Для получения фосфорилгуанидиновых остатков на этапе окисления встроенного в растущую цепь фосфитного звена вместо водно-органического раствора йода использовали раствор коммерчески доступного 2-азидо-1,3-диметилимидазолия гексафторфосфата в безводном ацетонитриле. В результате протекания реакции Штаудингера между таким азидом и промежуточным триэфирфосфитом происходит окисление атома фосфора ($P(III) \rightarrow P(V)$) с образованием ФГ-звена [9; 10]. Деблокирование щелочелавильных защитных групп и удаление олигонуклеотидов с твердофазного носителя проводили с использованием одной из

Таблица 3 — Структуры исследуемых ФГ-декануклеотидов.

Обозначение	Последовательность, 5'-3'	n^1	μ^2	M(теор.) г/моль	M(эксп.) г/моль
X	G ^o C ^o G ^o C ^o C ^o A ^o A ^o A ^o C ^o A	0	0.93	3006.00	-
X _{1;4;7}	G [*] C ^o G ^o C [*] C ^o A ^o A [*] A ^o C ^o A	3	0.69	3291.45	3289.70
X _{1;5;9}	G [*] C ^o G ^o C ^o C [*] A ^o A ^o A ^o C [*] A	3	0.69	3291.45	3290.00
X _{2;4;5;8}	G ^o C [*] G ^o C [*] C ^o A [*] A ^o A [*] C ^o A	4	0.60	3386.60	3385.10
X _{1-2;5-6;9}	G [*] C [*] G ^o C ^o C [*] A [*] A ^o A ^o C [*] A	5	0.48	3481.75	3480.80
X _{1-2;5;8-9}	G [*] C [*] G ^o C ^o C [*] A ^o A ^o A [*] C [*] A	5	0.48	3481.75	3480.80
X _{1;3;5;7;9}	G [*] C ^o G [*] C ^o C [*] A ^o A [*] A ^o C [*] A	5	0.48	3481.75	3480.80
X _{1-3;7-9}	G [*] C [*] G [*] C ^o C ^o A ^o A [*] A [*] C [*] A	6	0.36	3576.90	3576.20
X _{2-3;5-6;8-9}	G ^o C [*] G [*] C ^o C [*] A [*] A ^o A [*] C [*] A	6	0.36	3576.90	3575.30
X ₁₋₉	G [*] C [*] G [*] C [*] C [*] A [*] A [*] A [*] C [*] A	9	~0	3862.35	3862.0 [‡]

Где «*» – фосфорилгуанидиновая группа

¹ Число остатков ДМІ в декануклеотиде

² В условиях денатурирующего гель-электрофореза в 15% ПААГ относительную электрофоретическую подвижность μ оценивали как соотношение длины пробега ON и длины пробега лидирующего красителя – бромфенолового синего.

[‡] Масс-спектрометрический анализ X₁₋₉ проводили в режиме детекции положительно заряженных ионов (см. раздел 2).

классических схем, выдерживая полимерный носитель в смеси концентрированных водных растворов аммиака и метиламина (1:1 по объёму) в течение 2 часов при 56 °С. Полученные растворы упаривали, предварительно добавляя аликвоту водного раствора трис(гидроксиэтил)аминометана для обеспечения сохранности 5'-концевой диметокситритильной группы в ON. Выделение целевого, полноразмерного продукта проводили методом ОФ-ВЭЖХ, используя повышенную гидрофобность ON, содержащих 5'-концевую диметокситритиль-

ную группировку (данные не приведены). Для удаления диметокситритильной защитной группы обрабатывали выделенные олигонуклеотиды 80% раствором уксусной кислоты в воде при комнатной температуре в течение 7 мин. Кислоту удаляли путём двукратного переосаждения олигонуклеотидов из 2% раствора перхлората лития в ацетоне. Полученные в итоге ОН анализировали, задействуя методы аналитической ОФХ, денатурирующего гель-электрофореза, спектрофотометрии, термической денатурации и масс-спектрометрии.

3.1.1 Хроматографический и электрофоретический анализ ФГО

При анализе методом ОФХ выделенных ФГО было обнаружено, что с ростом числа модифицированных фосфатных групп увеличивается время удерживания олигонуклеотидов на неподвижной фазе “ProntoSIL-120-5-C18” (рисунок 3.2). 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. Другим важным следствием наличия фосфорилгуанидиновых групп в составе олигонуклеотида является уширение пика целевого продукта на профиле ОФХ. Каждый модифицированный фосфодиэфирный остаток в составе ФГО представлен парой диастереомеров, гидрофобные свойства которых, как было показано ранее [103], могут различаться. Таким образом, закономерным кажется некоторое уширение пика ФГО, содержащего 2^n диастереомеров, где n – число модифицированных звеньев в цепи олигомера.

Следует также отметить, что профили ОФХ олигонуклеотидов, содержащих равное число ДМІ (рисунок 3.2, $X_{1-2;5-6;9}$ и $X_{1-2;5;8-9}$), несколько различаются. По всей видимости, гидрофобность модифицированного ОН определяется не только количеством введённых остатков ДМІ, но и их расположением в нуклеотидной цепи, то есть ближайшим нуклеотидным окружением, способным влиять на степень экспонирования гидрофобного гуанидинового фрагмента в раствор [103].

Повышенная липофильность ФГО является немаловажным свойством, поскольку гидрофобные взаимодействия – это один из наиболее распространён-

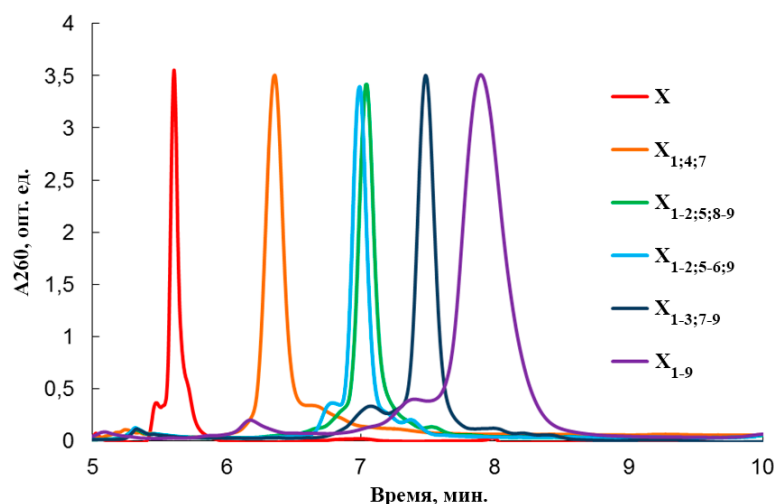


Рисунок 3.2 — Профили ОФХ индивидуальных олигонуклеотидов, содержащих различное число остатков DM1.

ных типов биомолекулярных взаимодействий, и во многом определяет широту использования, в частности, фосфотиоатных производных в биомедицинских приложениях [104]. Не исключено, что фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (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. Повышенная гидрофобность ФГО не означает, что данные производные плохо растворимы в воде. В миллимолярном водном растворе даже полностью модифицированный декануклеотид X_{1-9} не формировал осадка, в том числе при ультрацентрифугировании в течение 30 минут (13200 об/мин) или при охлаждении раствора до 4 °С.

Снижение эффективного заряда при введении в структуру ON остатков DM1 закономерно приводит к падению его электрофоретической подвижности в условиях стандартного денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле (рисунок 3.3). В таблице 3 приведены данные об относительной электрофоретической подвижности рассматриваемой серии ФГО в денатурирующем 15% ПААГ.

Видно, что электрофоретическая подвижность (μ) всех модифицированных олигонуклеотидов меньше, чем нативного олигомера X. Причём подвижность ФГО тем меньше, чем большее число остатков DM1 входит в его структуру. В пределе, когда остов полностью электронейтрален, ФГО пол-

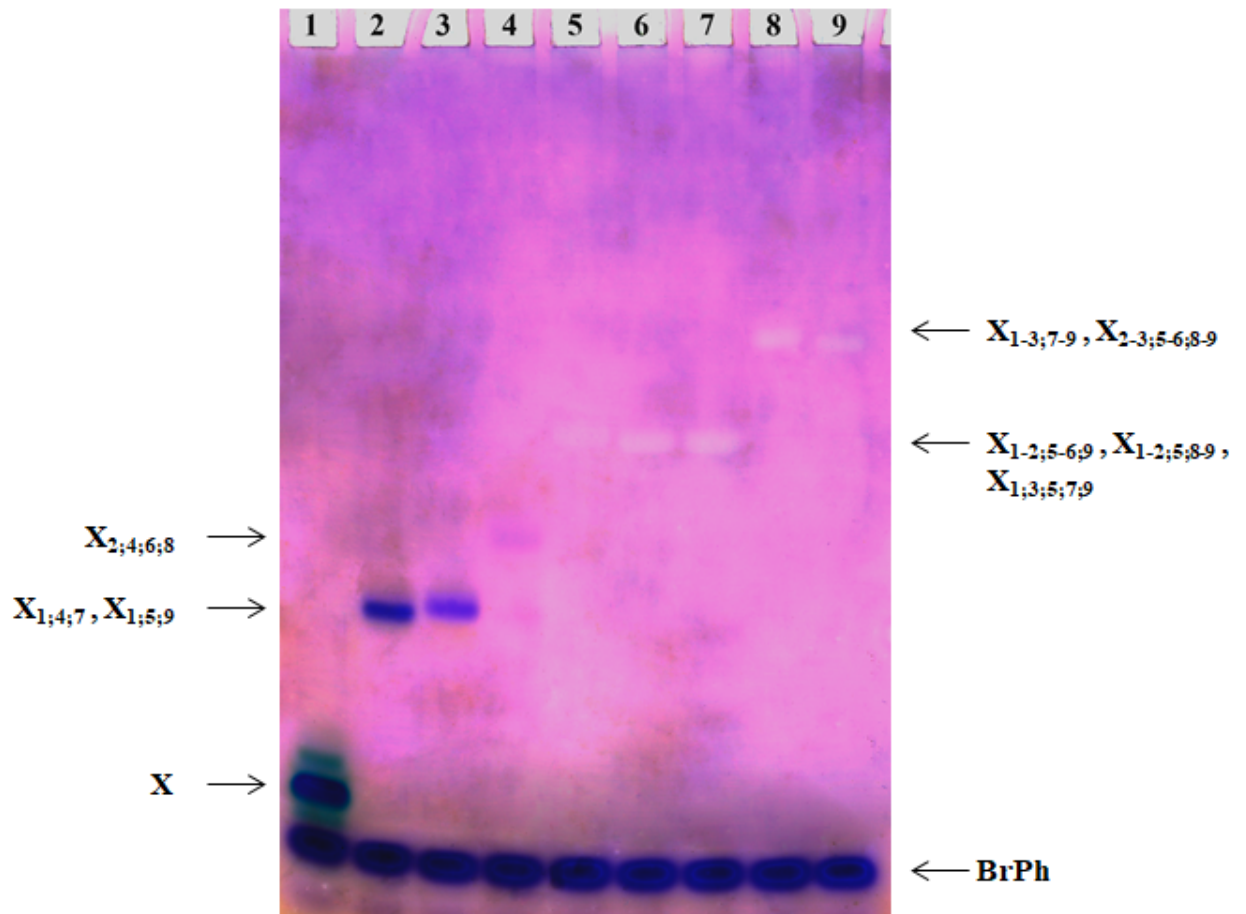


Рисунок 3.3 — Результат электрофореза ФГ-декануклеотидов в денатурирующем 15% ПААГ олигонуклеотидов: X (дор. 1), $X_{1;4;7}$ (дор. 2), $X_{1;5;9}$ (дор. 3), $X_{2;4;6;8}$ (дор. 4), $X_{1-2;5-6;9}$ (дор. 5), $X_{1-2;5;8-9}$ (дор. 6), $X_{1;3;5;7;9}$ (дор. 7), $X_{1-3;7-9}$ (дор. 8), $X_{2-3;5-6;8-9}$ (дор. 9). BrPh – краситель бромфеноловый синий.

ностью теряют электрофоретическую подвижность. Видно также, что ON, содержащие равное количество ДМІ остатков и обладающие равным суммарным зарядом остова, не проявляют значимых различий в значениях μ в денатурирующих условиях (Таблица 3, $n = 3, 5$ или 6).

Важно отметить, что несмотря на равное количество олигонуклеотидного материала, вносимого на дорожку геля, эффективность проявления модифицированных ФГО с помощью широко используемого красителя «StainsAll» оказывается заметно ниже, чем для немодифицированного аналога (рисунок 3.3). Например, образец $X_{2;4;6;8}$, содержащий 4 остатка ДМІ, при проявлении данным красителем едва заметен. Декануклеотиды с 5 или 6-тью модификациями (рисунок 3.3, дор. 5-9) вовсе не могут быть выявлены в геле таким подходом. По-видимому, значительное снижение заряда олигонуклеотида влечет за собой резкое снижение эффективности взаимодействия «нуклеиновая

кислота – краситель». Таким образом, для проявления немеченных ФГО при проведении электрофоретического анализа следует использовать приемы, связанные с визуализацией тени от олигомер-содержащего фрагмента геля при подсветке УФ-светом или использовать альтернативные подходы колориметрической прокраски гелей.

3.1.2 Электрофоретический анализ незаряженных ФГ-олиготимидилатов

Во второй половине двадцатого века был разработан подход к электрофоретическому анализу белков и пептидов в присутствии додецилсульфата натрия (Sodium Dodecyl Sulfate, «SDS»), параметром разделения в котором является молекулярная масса аналита [105]. Установлено, что SDS нековалентно связывается с гидрофобными участками белка в массовом соотношении 1,4 г SDS к 1 г белка, в результате чего образуется отрицательно заряженный ассоциат, способный двигаться под действием электрического поля, причём относительная подвижность аналита линейно зависит от десятичного логарифма его молекулярной массы согласно формуле $R_f = A - B * \lg(M_w)$ [106]. SDS-электрофорез получил широкое применение как метод фракционирования белков и пептидов, наиболее известным и распространённым в использовании протоколом SDS-электрофореза является метод Лэммли [107].

На данном этапе работы был опробован аналогичный подход: для проведения электрофоретического анализа заведомо электронейтральных ФГ-олиготимидилатов T_6^* , T_{10}^* , T_{15}^* , T_{20}^* , T_{26}^* (таблица 4) использовали полиакриламидный гель 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 (рисунок 3.4).

Видно, что все рассматриваемые ФГ-олиготимидилаты в присутствии SDS приобретают способность мигрировать в ПААГ. Однако в случае 0.1% SDS (рисунок 3.4, слева) полосы олигонуклеотидного материала обладают достаточно большой диффузностью, и, что более важно, их относительная электрофо-

Таблица 4 — Структуры электронейтральных ФГ-олиготимидилатов.

	Последовательность, 5'-3'
T ₆ [*]	T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T
T ₁₀ [*]	T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T
T ₁₅ [*]	T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T [*] T
T ₂₀ [*]	T [*] T
T ₂₆ [*]	T [*] T

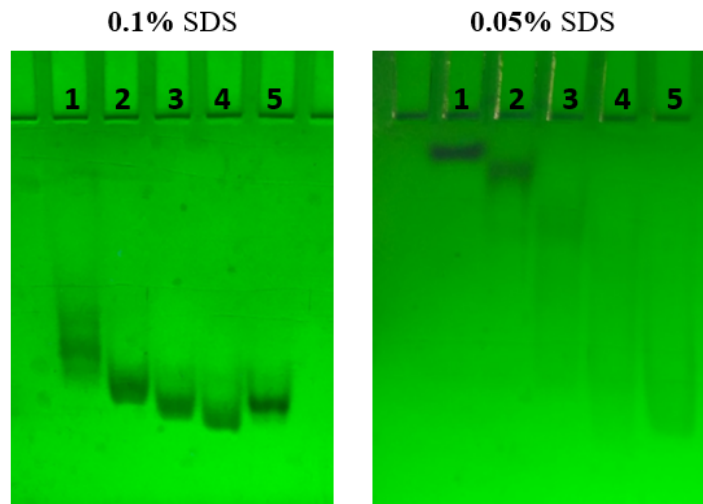


Рисунок 3.4 — Результат электрофореза в нативном 15% ПААГ электронейтральных олигонуклеотидов T₆^{*} (дор. 1), T₁₀^{*} (дор. 2), T₁₅^{*} (дор. 3), T₂₀^{*} (дор. 4), T₂₆^{*} (дор. 5) в присутствии 0.1% SDS (слева) или 0.05% SDS (справа).

В данном случае гель и буфер для нанесения не содержали мочевины.

ретикулярная подвижность нелинейно зависит от длины (молекулярной массы) рассматриваемых ОН. При понижении концентрации SDS до 0.05% (рисунок 3.4, справа) короткие ОН проявляются в виде относительно узкой полосы, однако с дальнейшим ростом длины нуклеотидной цепи диффузность полос резко возрастает. Вероятно, форма полос зависит от молярного соотношения ОН/SDS, а также от значения критической концентрации мицеллообразования SDS в рассматриваемом буферном растворе. Кроме того, на данном этапе гели не содержали хаотропных агентов; таким образом, рассмотренные выше эксперименты, по сути, выполнены в нативных условиях. Возможно, ФГО, обладая повышенной гидрофобностью, способны сами по себе формировать некие «гло-

булы», из-за чего нековалентное взаимодействие ON с SDS невозможно описать линейной зависимостью от длины или молекулярной массы ON.

В связи с этим далее был выполнен электрофорез в 15% ПААГ, содержащем одновременно 0.05% SDS и 5 М мочевины (рисунок 3.5). Буфер для нанесения также содержал оба эти компонента.

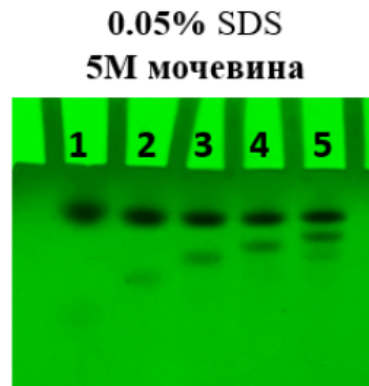


Рисунок 3.5 — Результат электрофореза в денатурирующем 15% ПААГ электро-нейтральных олигонуклеотидов T_6^* (дор. 1), T_{10}^* (дор. 2), T_{15}^* (дор. 3), T_{20}^* (дор. 4), T_{26}^* (дор. 5) в присутствии одновременно 0.05% SDS и 5 М мочевины

В денатурирующих условиях незаряженные олиготимидилаты демонстрируют совершенно иной характер миграции. Вероятно, что использование 5 М мочевины привело к увеличению критической концентрации мицеллообразования SDS (в соответствии с данными, представленными в работе [108]) и, предположительно, к разрушению внутри- или межмолекулярных ассоциатов ФГО как таковых. Таким образом, видимо, стало возможным взаимодействие «мономерного» SDS с олигонуклеотидным материалом. Тем не менее, относительная подвижность основных полос во всех дорожках геля (рисунок 3.5) практически одинакова, несмотря на значительное различие в протяженности рассматриваемых ON. Вероятно, при образовании ассоциатов «SDS–ON» происходит одновременно значимое увеличение и заряда, и эффективного размера аналита, что оказывает взаимно компенсирующее влияние на электрофоретическую подвижность ФГО, независимо от его длины.

Также важно отметить, что каждая дорожка геля содержит основную и побочную полосы, расстояние между которыми уменьшается при переходе к более протяженным ON. Ранее в работе [109] было показано, что фосфорилгуанидиновый фрагмент может разрушаться на этапе деблокирования ON в водном аммиаке с образованием нативного, заряженного межнуклеотидного

фосфата. Весьма вероятно, что побочные полосы соответствуют именно утере остатка DMI, а не обрывам нуклеотидной цепочки. Таким образом, проведение электрофоретического анализа ФГО в присутствии и SDS, и мочевины позволяет оценить «чистоту» полученных электронейтральных ON именно с точки зрения зарядового состояния. Можно предположить, что данный подход в сочетании с другими методами электрофоретического анализа незаряженных олигомеров [110] в будущем позволит надёжно контролировать гомогенность синтезируемых электронейтральных ФГО.

3.1.3 Масс-спектрометрический анализ ФГО

Анализ частично незаряженных декануклеотидов проводили методом электроспрей-ионизации (ESI MS). Из представленных результатов видно (рисунок 3.6), что увеличение числа незаряженных фосфатных групп при фиксированной протяжённости ON накладывает ограничение на число возможных детектируемых заряженных форм. Так, например, декануклеотид $X_{1-3;7-9}$, содержащий шесть остатков DMI, не может в выбранных условиях эксперимента обладать большим отрицательным зарядом, чем «3-» (таблица 5а). Как следствие, возникает ограничение на возможные величины m/z , которые могут быть зарегистрированы использованным прибором. 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 X_{1-9} проводили, добавив в образец раствор муравьиной кислоты до концентрации 20 мМ. Это позволило детектировать ON в виде положительно заряженного иона. В таблицах 5а и 5б приведено сравнение экспериментально полученных масс с теоретическими значениями для ФГО с различной степенью модификации остова.

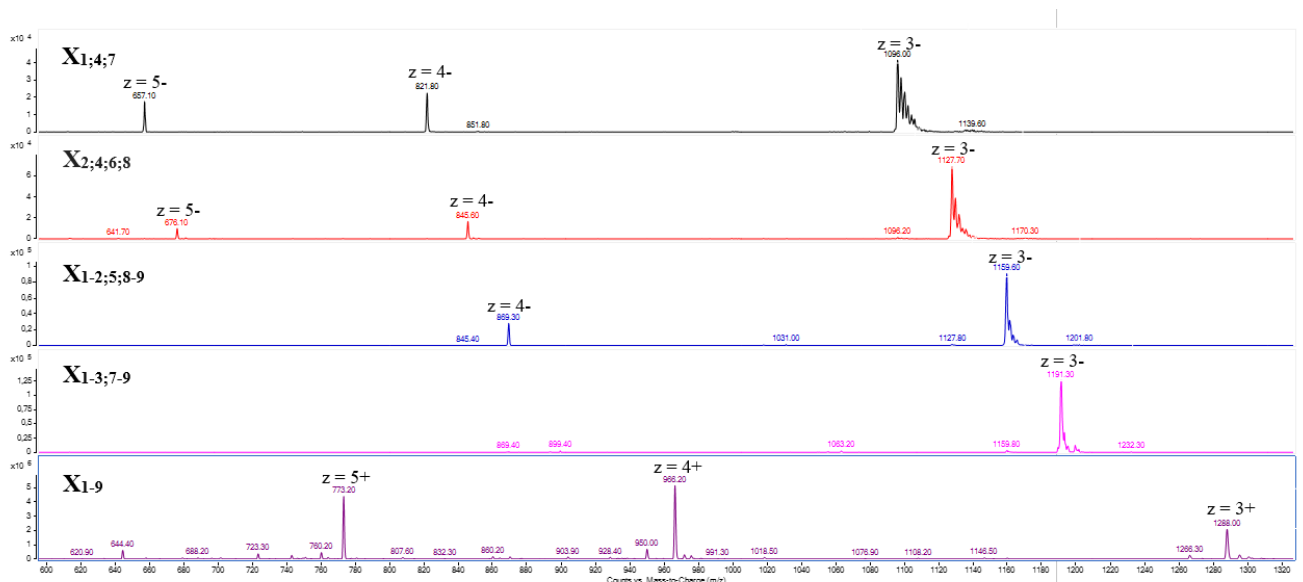


Рисунок 3.6 — Масс-спектры олигомеров $X_{1;4;7}$, $X_{2;4;6;8}$, $X_{1-2;5;8-9}$, $X_{1-3;7-9}$, X_{1-9} .

Таблица 5 — Результаты ESI MS анализа ФГ-декануклеотидов.

а) Сравнение теоретических значений m/z с экспериментальными данными.

	m_{theor}	z	m/z_{theor}	m/z_{exp}	m_{exp}
$X_{1;4;7}$	3291.5	3-	1096.2	1095.9	3290.7
		4-	821.9	821.8	3291.2
		5-	657.3	657.1	3290.5
$X_{2;4;6;8}$	3386.6	3-	1127.9	1127.7	3386.1
		4-	845.6	845.6	3386.4
		5-	676.3	676.1	3385.5
$X_{1-2;5;8-9}$	3481.8	3-	1159.6	1159.6	3481.8
		4-	869.4	869.3	3481.2
$X_{1-3;7-9}$	3576.9	3-	1191.3	1191.4	3576.3
X_{1-9}	3862.35	3+	1288.45	1288.0	3861
		4+	966.6	966.2	3860.8
		5+	773.5	773.2	3861

б) Полученные экспериментально значения масс олигомеров $X_{1;5;9}$, $X_{1;3;5;7;9}$, $X_{1-2;5-6;9}$, $X_{2-3;5-6;8-9}$.

	m_{theor}	m_{exp}	Число *
$X_{1;5;9}$	3291.5	3290.7	3
$X_{1;3;5;7;9}$	3481.8	3481.8	5
$X_{1-2;5-6;9}$	3481.8	3481.5	5
$X_{2-3;5-6;8-9}$	3576.9	3577.2	6

3.1.4 Спектрофотометрический анализ ФГО

Известно, что для среднестатистической последовательности ДНК максимум поглощения находится вблизи 260 нм. Другим важным фактором, характеризующим качество олигонуклеотидных препаратов, являются соотношения интенсивностей поглощения света на длинах волн 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}), а также 260 и 230 нм (A_{260}/A_{230}). Для водных растворов индивидуальных нативных ОН значения этих соотношений лежат в диапазоне 1.8-2.0. Введение остатков ДМІ в структуру олигонуклеотида может отразиться на профиле спектра поглощения [103]. В связи с этим важно было выявить особенности в профиле спектра поглощения олигонуклеотидов, содержащих ФГ-фрагмент, в коротковолновом диапазоне длин волн. На рисунке 3.7 приведены спектры оптического поглощения пары модифицированных ФГО – $X_{1;5;9}$ и $X_{1-3;7-9}$, содержащих различное число остатков ДМІ – 3 и 6 соответственно, а также их немодифицированного аналога X .

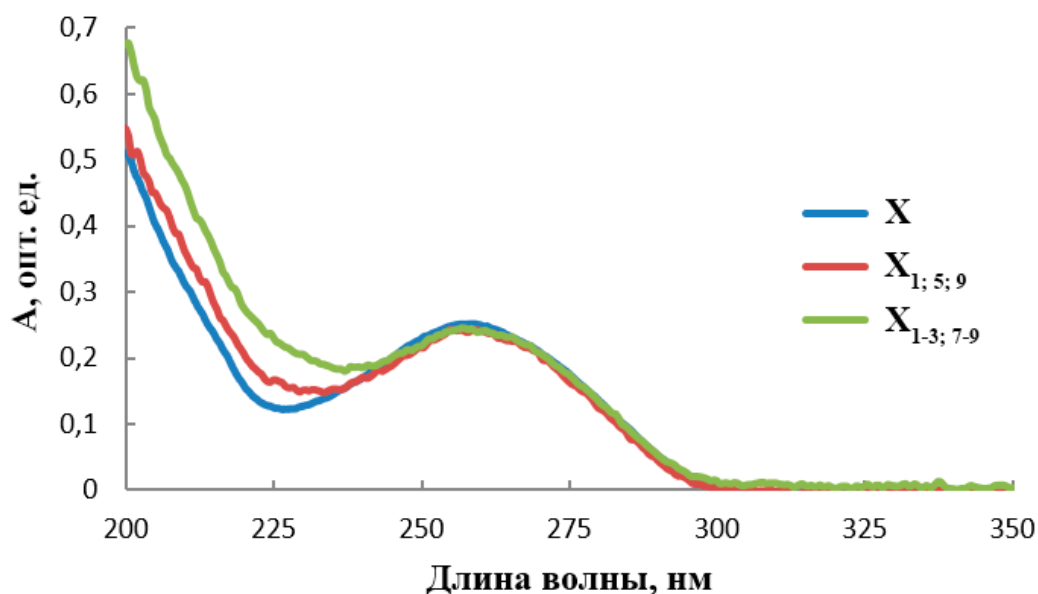


Рисунок 3.7 — Профили спектров оптического поглощения олигомеров X , $X_{1;5;9}$ и $X_{1-3;7-9}$.

Видно, что при практически полном совпадении интенсивностей поглощения света на длине волны 260 нм профили представленных спектров заметно различаются в диапазоне длин волны 200-240 нм: олигонуклеотид, содержащий большее число остатков ДМІ, поглощает интенсивнее в этой области спектра.

При этом значения A_{260}/A_{230} для обоих модифицированных ОН ниже, чем ожидалось бы для нативной ДНК: 1.6 для $X_{1;5;9}$ и 1.2 для $X_{1-3;7-9}$ (таблица 6). Отношение A_{260}/A_{280} близко к ожидаемому для нативного олигонуклеотида уровню: 1.9 для $X_{1;5;9}$ и 1.8 для $X_{1-3;7-9}$. Важно, что для различных ФГО с равным числом остатков ДМІ и одинаковой нуклеотидной последовательностью значимых различий в УФ-части спектра не обнаруживается (данные не приведены). Влияние ФГ-групп на профили спектров поглощения ОН, по-видимому, обусловлено особенностью электронной конфигурации в сопряжённом фосфорилгуанидиновом фрагменте, наличие которого и в случае низкомолекулярных соединений ненуклеотидной природы аналогичным образом характеризует их УФ-спектр [111]. Таким образом, указанную особенность спектральных характеристик ФГО следует учитывать при работе с данными олигонуклеотидными производными. В противном случае повышенная интенсивность поглощения света 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).

Таблица 6 — Значения отношений A_{260}/A_{230} и A_{260}/A_{280} для нативного и ФГ-декануклеотидов

	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
X	2.0	1.8
$X_{1;5;9}$	1.6	1.9
$X_{1-3;7-9}$	1.2	1.8

3.1.5 Исследование гибридизационных свойств ФГО

Известно, что введение в состав олигонуклеотидов различных модификаций может привести к существенному изменению температуры плавления формируемого им комплекса с комплементарной матрицей [51; 112]. На следующем этапе работы методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала была исследована термическая стабильность ДНК/ДНК-комплексов, образованных немодифицированным декануклеотидом 5'-TGTTTGGCGC-3' (М), последовательность которого комплементарна всем представленным в таблице 3 ФГО.

Исследование термической стабильности ДНК/ДНК комплексов проводили в растворах с различным солевым составом с целью определить эффекты, вызванные введением электронейтральных остатков ДМІ в структуру одной из взаимодействующих цепей. Параметры ионной силы растворов варьировали в широких пределах. Все полученные данные приведены на рисунке 3.8. Можно заметить, что термическая стабильность как нативного М/Х, так и частично модифицированных комплексов изменяются симбатно во всех растворах, в отличие от комплекса М/Х₁₋₉, содержащего полностью модифицированный олигомер.

Исходя из структуры фосфорилгуанидинового остатка, можно предположить, что его введение может оказывать двоякое влияние. С одной стороны, уменьшение эффективного заряда ФГО должно, по аналогии с МО и ПНК, позитивно сказываться на стабильности формируемых ими комплексов с матрицей ДНК. Этот эффект должен быть особенно выражен при низкой ионной силе растворов [113]. С другой стороны, введение объемных группировок по межнуклеозидному фосфату может вызвать возмущение пространственной структуры двойной спирали ДНК, особенно в том случае, когда остов содержит несколько подряд идущих фосфорилгуанидиновых групп. Такой эффект должен быть заметен в концентрированных солевых растворах, в составе которых эффективность реализации гидрофобных взаимодействий выше.

Сравнительные данные по величинам температур плавления всех исследованных модифицированных и нативного комплексов, определённые для всех использованных в работе растворов с различными ионными силами, представлены на рисунке 3.8. Видно, что значения температур плавления (Т. пл.)

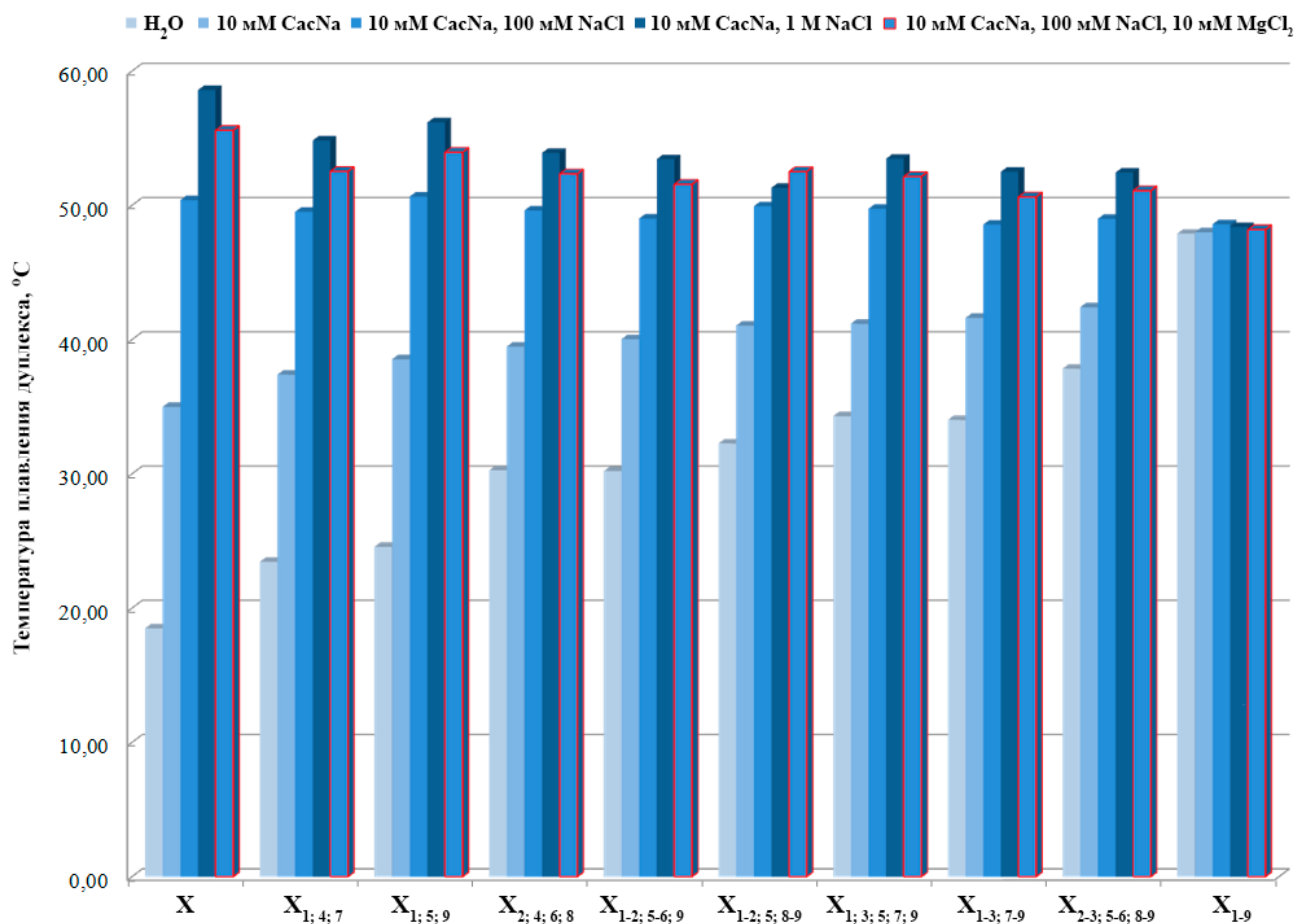


Рисунок 3.8 — Результаты термической денатурации комплементарных ДНК-комплексов, образованных указанными ФГ-олигомерами и нативной комплементарной матрицей, в различных солевых условиях.

комплементарных ДНК комплексов в представленной выборке варьируют в широком диапазоне – более 35 °С. Как и следовало ожидать, минимальную термостабильность демонстрирует ДНК/ДНК комплекс нативного олигонуклеотида X в деионизованной воде: температура плавления в этом случае не превышает 20 °С. Сама возможность формирования комплексов относительно коротких олигонуклеотидов в воде описана ранее [114] и, по-видимому, связана с достаточностью присутствия в образце противоионов, например, $[Me^+] < 1$ мМ, которые исходно входили в состав солевой формы олигонуклеотида, полученной после его очистки и выделения (см. раздел 2). Максимальную T. пл., равную 58.6 °С, демонстрирует этот же нативный комплекс, но в условиях максимально приближенных к физиологическим, то есть в присутствии как Na^+ , так и Mg^{2+} . Наличие остатков ДМІ в комплексах ФГО практически во всех случаях приводит к резко выраженной стабилизации. В ультранизкосолевых ($[Me^+] < 1$ мМ) и низкосолевых ($[Na^+] = 10$ мМ) условиях комплексообразования, каждая

введённая фосфорилгуанидиновая группа приводит к росту T_m пл. на 2.7 ± 0.6 и 1.1 ± 0.2 °C/DMI соответственно. В то же время, в условиях умеренной ионной силы ($[Na^+] = 110$ mM) стабилизирующий эффект фосфорилгуанидиновых групп практически исчезает. В среднем отклик температуры плавления комплексов на введение остатка DMI в этих условиях составляет -0.2 ± 0.1 °C/DMI. Повышенное содержание соли в образце, как и ожидалось, влечёт некоторую дестабилизацию комплексов ФГО. Относительно нативного предшественника, T_m пл. модифицированных дуплексов изменяется на -1.2 ± 0.4 °C/DMI ($[Na^+] = 110$ mM, $[Mg^{2+}] = 10$ mM) и -0.8 ± 0.1 °C/DMI ($[Na^+] = 110$ mM). Важно отметить, что чем выше степень замещения остова ФГО остатками DMI, тем менее выраженной становится зависимость термостабильности комплекса с модифицированной цепью от ионной силы раствора. Примечательно, что, например, декануклеотиды с различным профилем модификации остова, но содержащие по шесть DMI групп каждый ($X_{1-3;7-9}$ и $X_{2-3;5-6;8-9}$), образуют в низкосолевых растворах комплексы с достоверно различающимися значениями T_m пл. Это указывает на то, что стабильность комплекса зависит не только от числа модифицированных фосфатов, но и от расположения модификаций в остове ФГО, то есть от взаимной удалённости/сближенности остатков DMI и их локального нуклеотидного окружения.

В рамках данной работы мы не можем детально проанализировать влияние нуклеотидного контекста на солевую зависимость термостабильности комплексов ФГО. Однако полученные данные убедительно свидетельствуют, что для олигомеров с высокой степенью модификации остова ($> 50\%$) в условиях дефицита противоионов несколько бóльшим средством к ДНК матрице будет обладать ФГО, в структуре которого минимизирована средняя протяженность оставшихся без модификации, заряженных фосфодиэфирных фрагментов. Максимальная длина непрерывного немодифицированного фрагмента в дуплексе, сформированном ФГО $X_{1-3;7-9}$, включает четыре пары оснований и, соответственно, шесть расположенных друг напротив друга отрицательно заряженных фосфатных остатков. В результате в условиях ультранизкой ионной силы T_m пл. такой дуплексной структуры составляет 34.0 °C, что почти на 4 °C ниже соответствующей величины для комплекса ФГО $X_{2-3;5-6;8-9}$, в котором столь протяжённое заряженное «окно» отсутствует.

Одним из наиболее значимых результатов данной части работы является тот факт, что в случае полностью модифицированного ФГО X_{1-9} термоста-

бильность комплементарного комплекса перестаёт зависеть от концентрации катионов в растворе. Вне зависимости от выбранных солевых условий Т. пл. комплекса этого электронейтрального олигомера с ДНК с хорошей точностью составляет величину 48.2 ± 0.3 °С. Необходимо отметить, что такая унифицированная по условиям среды термостабильность ФГО-содержащего комплекса оказывается несколько ниже, на 7-10 °С, чем термостабильность нативной дуплексной структуры в высокосолевых растворах. Однако, при дефиците противоионов в среде Т. пл. ДНК/ДНК дуплекса с участием X_{1-9} значительно превосходит (на несколько десятков градусов – до 29 °С) Т. пл. нативной двойной спирали эквивалентного нуклеотидного состава.

Таким образом, повышенная гидрофобность ФГО олигомеров может препятствовать их комплексообразованию в условиях высокой ионной силы, однако данный недостаток с избытком компенсируется при переходе к использованию ФГО в низкосолевых средах. Использование деионизованной воды в качестве растворителя способствует денатурации внутри- или межмолекулярных комплементарных комплексов природных нуклеиновых структур. В случае использования полностью модифицированных ФГО это обстоятельство должно способствовать формированию гибридных ФГО/ДНК(РНК) дуплексных структур. Этот факт указывает на высокий потенциал применения фосфорилгуанидиновых производных для решения практических задач, подразумевающих анализ природных нуклеиновых кислот, обладающих сложной внутренней структурой.

3.2 Синтез ФГ-олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 3'-концевой остаток биотина

Синтез производных ОН, содержащих сразу несколько различных модификаций, часто является нетривиальной задачей, тем более в условиях стандартного автоматического амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов: использование коммерчески доступных нуклеотидных мономеров и полимерных носителей накладывает свои ограничения на возможные условия постсинтетической обработки.

В качестве примера функционального производного на основе ФГ-ДНК были синтезированы 26-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие на 3'-конце ненуклеотидную биотиновую вставку. Остаток биотина является важным функциональным заместителем, часто используемым, например, для иммобилизации биомолекул на поверхности за счёт образования чрезвычайно прочного нековалентного комплекса биотина и стрептавидина [115], а также для колориметрической оценки выхода продуктов ферментативных реакций [116].

Таблица 7 — Структуры 3'-биотиновых 26-звенных нативного и ФГ-олигонуклеотидов.

	Последовательность, 5'-3'
N26 [○]	C [○] T [○] T [○] T [○] C [○] G [○] C [○] T [○] C [○] T [○] G [○] G [○] T [○] C [○] C [○] G [○] T [○] C [○] T [○] T [○] G [○] C [○] G [○] C [○] C [○] -[Bio]
N26 [*]	C [*] T [*] T [*] T [*] C [*] G [*] C [*] T [*] C [*] T [*] G [*] G [*] T [*] C [*] C [*] G [*] T [*] C [*] T [*] T [*] G [*] C [*] G [*] C [*] C [*] -[Bio]
N25 ^{*1} [○]	C [*] T [*] T [*] T [*] C [*] G [*] C [*] T [*] C [*] T [*] G [*] G [*] T [*] C [*] C [*] G [*] T [*] C [*] T [*] T [*] G [*] C [*] G [*] C [*] C [○] -[Bio]

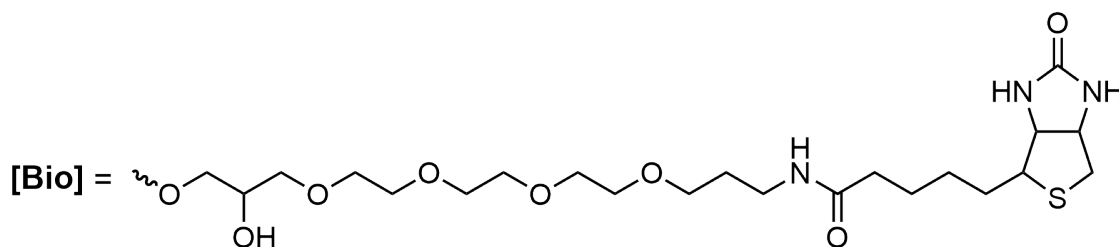


Рисунок 3.9 — Структура ненуклеотидной вставки [Bio] после деблокирования.

Было обнаружено, что выход целевого продукта синтеза фосфорилгуанидинового олигонуклеотида (N26^{*}, таблица 7), в составе которого присутствует 3'-концевая ненуклеотидная вставка, содержащая этиленгликолевый линкер (рисунок 3.9), значительно ниже такового для нативного олигонуклеотида N26[○]

(данные не приведены). Для прояснения причин деградации целевого продукта была проведена характеристика выделенных производных олигонуклеотидов методом масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией (ESI MS). Полученные масс-спектры приведены на рисунке 3.10 и 3.11.

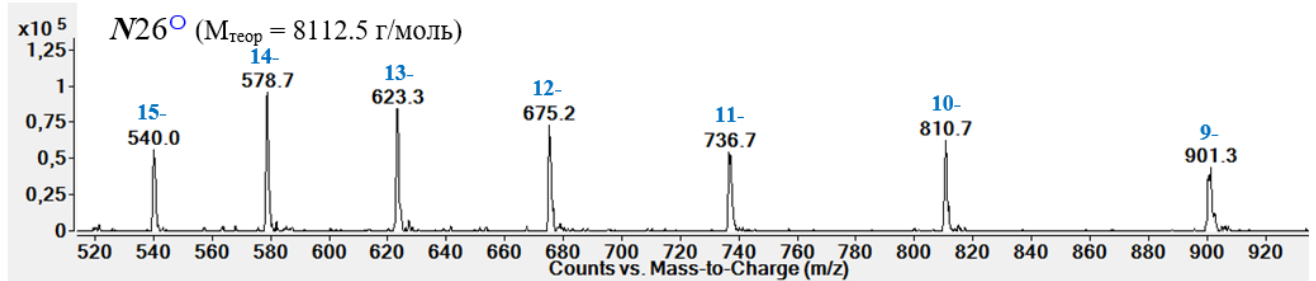


Рисунок 3.10 — Масс-спектр биотинового олигонуклеотида N26^o.

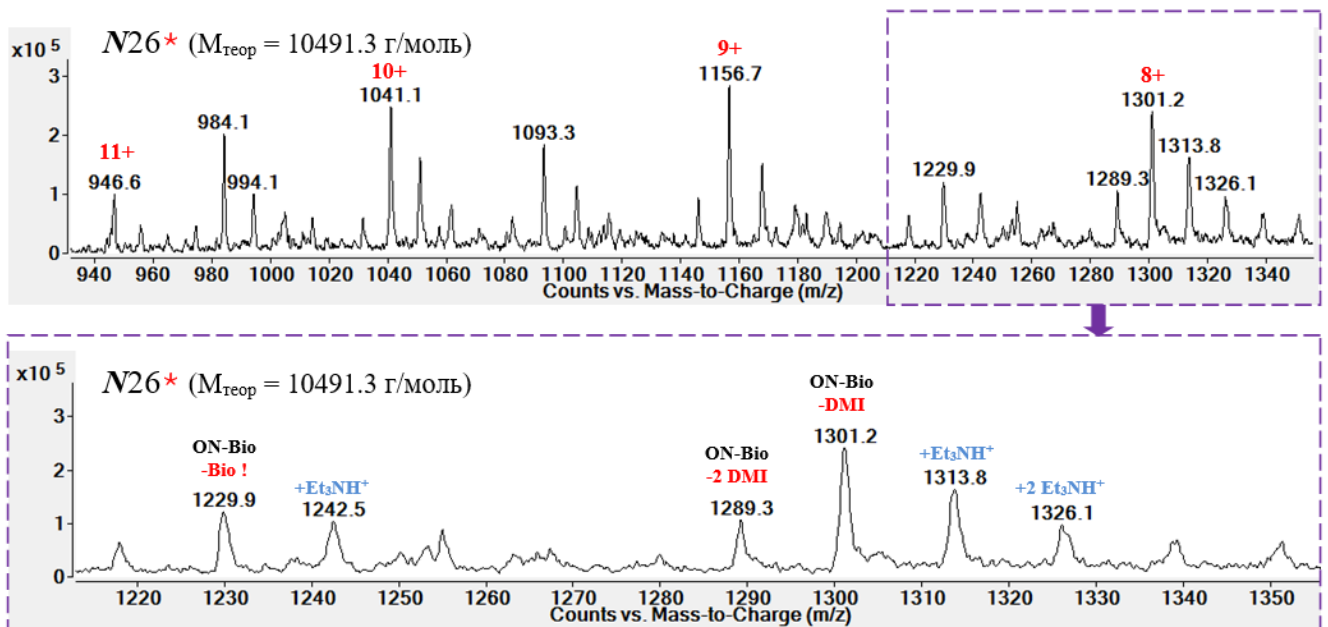


Рисунок 3.11 — Масс-спектр биотинового олигонуклеотида N26*.

Таблица 8 — Значения m/z , соответствующие основным продуктам деградации N26* – утере нуклеотидного звена [Bio], одного или двух остатков DMI.

m/z	z	M_{ion}	
1229.9	8+	9839.2	[ON] + 7[H ⁺] + [Li ⁺]
1289.3	8+	10314,4	[ON-Bio] + 7[H ⁺] + [Li ⁺] - 2[DMI]
1301.1	8+	10408.8	[ON-Bio] + 7[H ⁺] + [Li ⁺] - [DMI]

В случае нативного N26^o полученный профиль масс-спектра содержал группу сигналов, соответствующих различным зарядовым формам ($z = 15-$,

14-, ..., 9-) данного олигонуклеотида (рисунок 3.10). Сопоставимых по интенсивности сигналов, соответствующих побочным продуктам, в спектре не обнаруживали. Масс-спектр фосфорилгуанидинового олигонуклеотида N26* имел сложный вид (рисунок 3.11). Для каждой зарядовой формы можно обнаружить группы сигналов, отличающихся по значениям m/z . Рассмотрим одну из таких групп более подробно. Прежде всего, видно, что ФГО детектируется как поликатион, содержащий, в том числе, катионы триэтиламмония (ТЕА, компонент буферной смеси). За счёт этого наблюдается смещение m/z в сторону бóльших значений, например, сигналы с отношением $m/z = 1301.2, 1313.8$ и 1326.1 – отвечают одной и той же зарядовой форме ($z = 8+$) одной молекулы, но с различными «видами» катионов, вошедших в структуру детектированного поликатиона: $[M+8H]^{8+}$, $[M+TEA+7H]^{8+}$, $[M+2TEA+6H]^{8+}$, соответственно. В спектре N26* присутствуют также и сигналы с меньшими значениями m/z , что свидетельствует, вероятно, о деградации целевого продукта синтеза. При этом не были обнаружены значения массы молекулярных ионов, соответствующих полноразмерному продукту синтеза, в котором содержались бы все 25 остатков N,N,N',N'-замещенного гуанидина (DMI): все наблюдаемые сигналы соответствовали утере либо хотя бы одного остатка DMI, либо всего биотин-содержащего нуклеотидного звена (таблица 8).

Дополнительно был проанализирован в режиме детекции поликатионов олигонуклеотид N26^o, в полученном спектре отсутствовали пики, свидетельствующие о деградации данного немодифицированного олигонуклеотида (данные не приведены). Поскольку процедуры пробоподготовки и самого масс-спектрометрического анализа не приводили к деградации биотинилированного олигонуклеотида, то, вероятно, в случае N26* именно непосредственная близость ФГ-группы и нуклеотидного звена на 3'-конце ОН приводит к разрушению целевого продукта на каком-то из этапов синтеза и/или выделения олигонуклеотида. Для того, чтобы проверить это предположение, был синтезирован олигодезоксирибонуклеотид N25*1^o (таблица 7), в котором между первым (с 3'-конца последовательности) нуклеотидным и нуклеотидным звеньями был сохранён немодифицированный фосфодиэфирный остаток. Пост-синтетическую обработку и выделение целевого продукта проводили согласно приёмам олигонуклеотидного синтеза, описанным выше. Полученный продукт N25*1^o был также охарактеризован методом масс-спектрометрии, и в спектре не было обнаружено пиков, отвечающих «утере» нуклеотидного звена (данные

не приведены). С помощью метода SDS гель-электрофореза, адаптированного ранее для анализа частично заряженных и электронейтральных аналогов олигонуклеотидов, было проведено сравнение продуктов синтеза $N26^*$ и $N25^*1^{\circ}$ (рисунок 3.12).

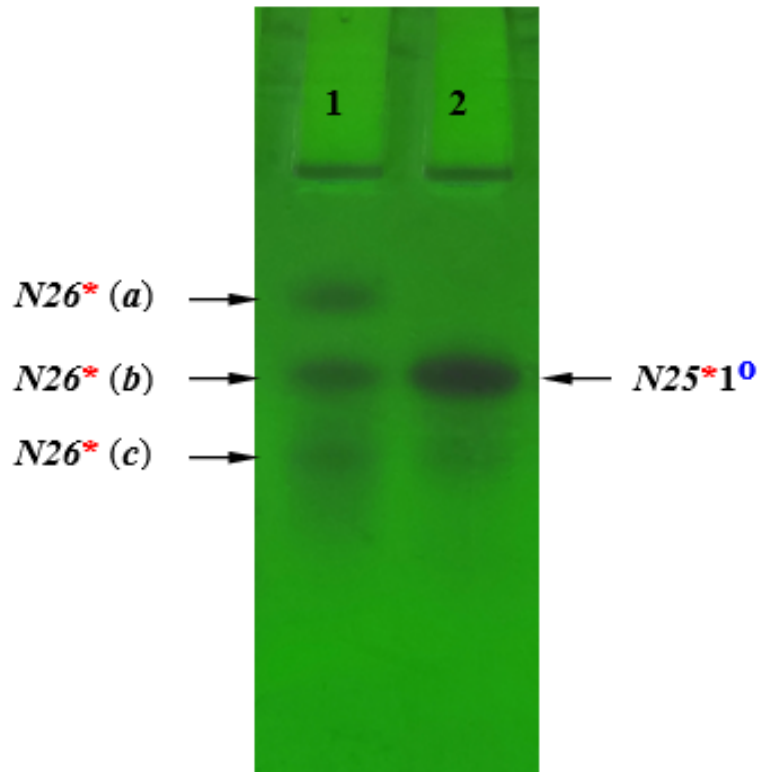


Рисунок 3.12 — Результат электрофоретического анализа биотиновых ФГО в 15% денат. ПААГ, содержащем 0.05% SDS, где дор. 1 – $N26^*$, дор. 2 – $N25^*1^{\circ}$.

Для полностью ФГ-замещённого $N26^*$ (дор. 1, рисунок 3.12) после электрофоретического разделения наблюдаются три отдельных пятна. Вероятно, они соответствуют обнаруженным с помощью масс-спектров продуктам распада, то есть либо утере биотин-содержащего звена с сохранением всех остатков ДМІ, либо, наоборот, утере одного или двух остатков ДМІ с сохранением биотинового звена (таблица 8). Действительно, при отсутствии нуклеотидного звена олигонуклеотид $N26^*$ сохраняет свою электронейтральность, и верхнее пятно **a** в дорожке 1 может соответствовать ОН с незаряженным остовом. В случае утери остатков ДМІ остов $N26^*$ приобретает отрицательный заряд, и это должно привести к увеличению электрофоретической подвижности. Соответственно, пятна **b** и **c** могут быть продуктами деструкции, в которых сохранено нуклеотидное звено, но утерян 1 или 2 остатка ДМІ. В дорожке 2, где присутствует

аналогичный по нуклеотидной последовательности ФГО N25*1^o, есть только одно пятно, и его электрофоретическая подвижность полностью совпадает с таковой для пятна **b** в дорожке 1.

Таким образом, видно, что при наличии ФГ-группы в 3'-концевой позиции, вблизи ненуклеотидного звена, N26* деградирует с образованием трёх продуктов в сравнимых количествах. Принимая во внимание этот факт, а также химическую структуру терминального ненуклеотидного звена (рисунок 3.9), можно предположить, что, вероятно, реализуется «анхимерное содействие», согласно которому деструкция ФГ-группы ускоряется соседней гидроксигруппой линкера на основе замещённого этиленгликолевого остатка, входящего в состав ненуклеотидного звена.

3.2.1 Модель деструкции 3'-функционализированных производных ФГО

Фосфорилгуанидиновая группа в межнуклеозидном положении, в целом, является электронейтральной после проведения деблокирования ON, но в то же время вероятно, что в ФГ-группе может реализовываться распределение электронной плотности согласно резонансным структурам, приведённым на рисунке 3.13.

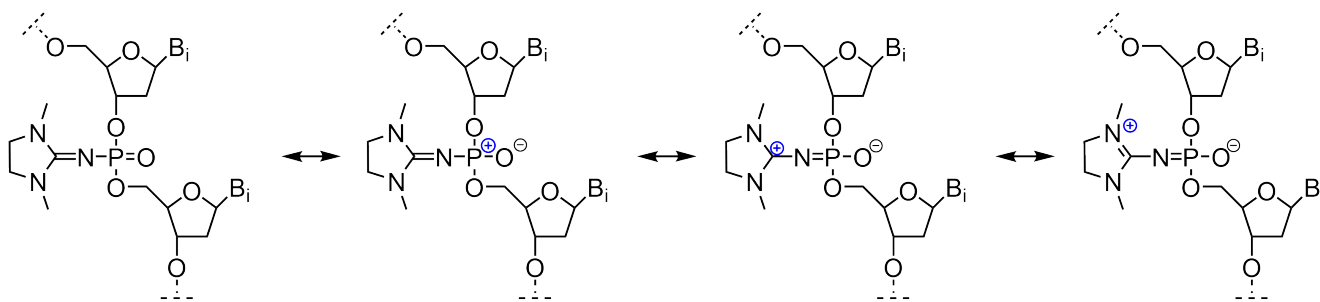


Рисунок 3.13 — Резонансные структуры, возможные для ФГ-звена, расположенного в межнуклеозидной позиции

Остаток DMI в данной схеме может выступать в роли донора электронов по мезомерному эффекту, стабилизируя положительный заряд, возникший на атоме фосфора в результате поляризации двойной связи P=O. Таким образом, возможно, что в присутствии DMI двойная связь P=O ионизована в большей

степени, нежели в случае немодифицированной фосфатной группы. В том случае, когда ФГ-группа находится вблизи ненуклеотидного звена (рисунок 3.14), становится возможной 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 утере либо остатка DMI, либо ненуклеотидного звена. Аналогичный эффект гидролиза P–O или P–N связей при реализации анхимерного эффекта карбоксильной и гидроксигрупп описан в работах [117; 118].

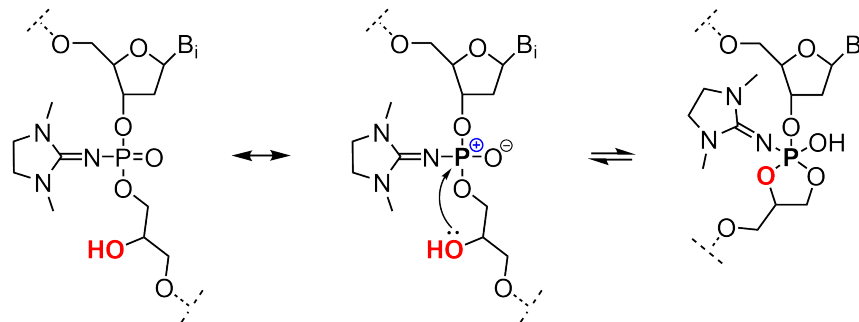


Рисунок 3.14 — Схема внутримолекулярного образования циклического эфира фосфорной кислоты вследствие атаки OH-группы линкера по атому фосфора ФГ-звена.

Для проверки этой гипотезы были синтезированы модельные гомо- и гетеротринуклеотиды, содержащие 3'-концевое ненуклеотидное звено и остатки DMI в различных позициях (таблица 9). Все указанные тринуклеотиды после синтеза были обработаны концентрированным раствором аммиака (2 ч, 56 °C), и каждая реакционная смесь (без предварительного разделения компонентов реакционной смеси) была проанализирована методом масс-спектрометрии.

Таблица 9 — Структуры и теоретические молекулярные массы биотиновых гомо- и гетеротринуклеотидов с различным расположением ФГ-звеньев.

Последовательность, 5'-3'	M_{theor} , г/моль
T* ^o T* ^o T ^o -[Bio]	1609.5
T ^o T ^o T* ^o -[Bio]	1515.4
C ^o A* ^o T ^o -[Bio]	1509.4
C ^o A ^o T* ^o -[Bio]	1509.4

На примере гомотимидилатных олигонуклеотидов T*^oT*^oT^o-[Bio] и T^oT^oT*^o-[Bio] рассмотрим результаты масс-спектрометрического анализа в

режиме детектирования анионов (рисунок 3.15). Для данных производных тритимидилатов возможны только две зарядовые формы ($z = 1^-$ или 2^-), поскольку структуры содержат лишь одну или две фосфатные группы, способные нести отрицательный заряд. В случае, когда остатки ДМТ находятся только между нуклеотидными звеньями (рисунок 3.15, сверху), в профиле масс-спектра наблюдали сигнал, соответствующий полноразмерному продукту синтеза $T^*T^*T^O-[Bio]$. Других значений m/z , свидетельствующих о деградации целевого продукта, в спектре не наблюдали.

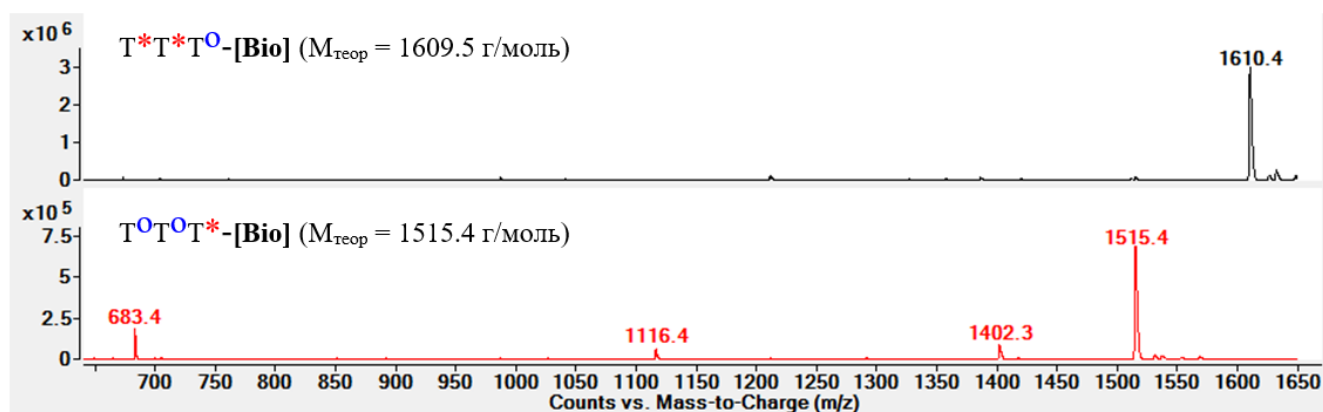


Рисунок 3.15 — Масс-спектры биотиновых тритимидилатов $T^*T^*T^O-[Bio]$ (сверху) и $T^O T^O T^*-[Bio]$ (снизу).

Во втором случае, когда ФГ-группа находится на 3'-конце рядом с нуклеотидной вставкой, в полученном масс-спектре присутствует как сигнал, соответствующий целевому продукту $T^O T^O T^*-[Bio]$ ($m/z = 1515.4$, $z = 1^-$), так и другие – с меньшими значениями m/z (рисунок 3.15, 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.

Согласно описанной выше гипотезе, тринуклеотид $T^O T^O T^*-[Bio]$ 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 3.16 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

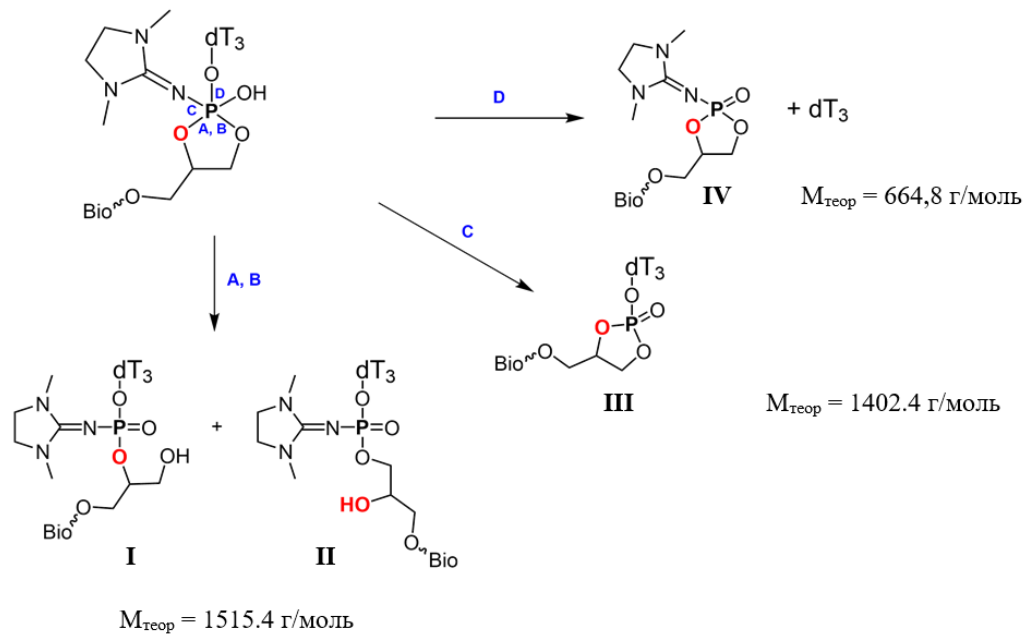


Рисунок 3.16 — Схема деструкции циклического эфира фосфорной кислоты с разрывом одной из связей А, В, С, D. На рисунке приведены теоретические молекулярные массы биотинсодержащих продуктов **I-IV**.

образованием ациклических форм, что следует учитывать при анализе масс-спектров.

Так, помимо сигнала, соответствующего целевому продукту **II** (или его изомерной форме **I**, образующейся в соответствии со схемой по пути В), наблюдается пик со значением $m/z = 1402.3$ (рисунок 3.15, снизу). Данное значение может соответствовать циклическому фосфату **III**, образовавшемуся по пути С вследствие разрыва связи P–N и утери остатка DMI. Также в полученном спектре было обнаружено значение m/z равное 683.4, что может соответствовать образованному в случае распада по пути D продукту **IV** в ациклической форме.

Таким образом, исходя из результатов масс-спектрометрического анализа реакционных смесей, полученных в результате 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 $T^{\circ}T^{\circ}T^*-\text{[Bio]}$. Значения масс, найденных для продуктов распада целевого ON, не противоречат предложенной схеме, основанной на внутримолекулярном образовании циклического эфира фосфорной кислоты при участии прилегающей гидроксигруппы нуклеотидного звена. Для гетеротринуклеотидов $C^{\circ}A^*T^{\circ}-\text{[Bio]}$ и $C^{\circ}A^{\circ}T^*-\text{[Bio]}$ результаты ESI масс-спектрометрического анали-

за ничем принципиально не отличались: деструкция наблюдалась только тогда, когда возможна внутримолекулярная нуклеофильная атака гидроксигруппы по ФГ-группе (с образованием пятичленного цикла).

На примере гетеротринуклеотидов $C^{\circ}A^*T^{\circ}-[Bio]$ и $C^{\circ}A^{\circ}T^*-[Bio]$, содержащих одну ФГ-группу, дополнительно рассматривали различные условия деблокирования (удаления с полимерного носителя) при $56^{\circ}C$, варьируя время (2 ч или ночь) обработки концентрированным раствором аммиака. Кроме того, опробовали подход, предложенный в работе [109]: последовательно обрабатывали ОН безводным 50% раствором триэтиламина в ацетонитриле (1 ч, $56^{\circ}C$), после чего удаляли триэтиламин и обрабатывали ОН раствором аммиака (2 ч, $56^{\circ}C$). Такой подход позволяет провести селективное β -элиминирование цианэтильной защитной группы, не удаляя олигонуклеотид с полимерного носителя СРГ, что, согласно данным работы [109], «стабилизирует» ФГ-группу при дальнейшей обработке аммиаком. Все реакционные смеси анализировали методом ОФХ (рисунок 3.17).

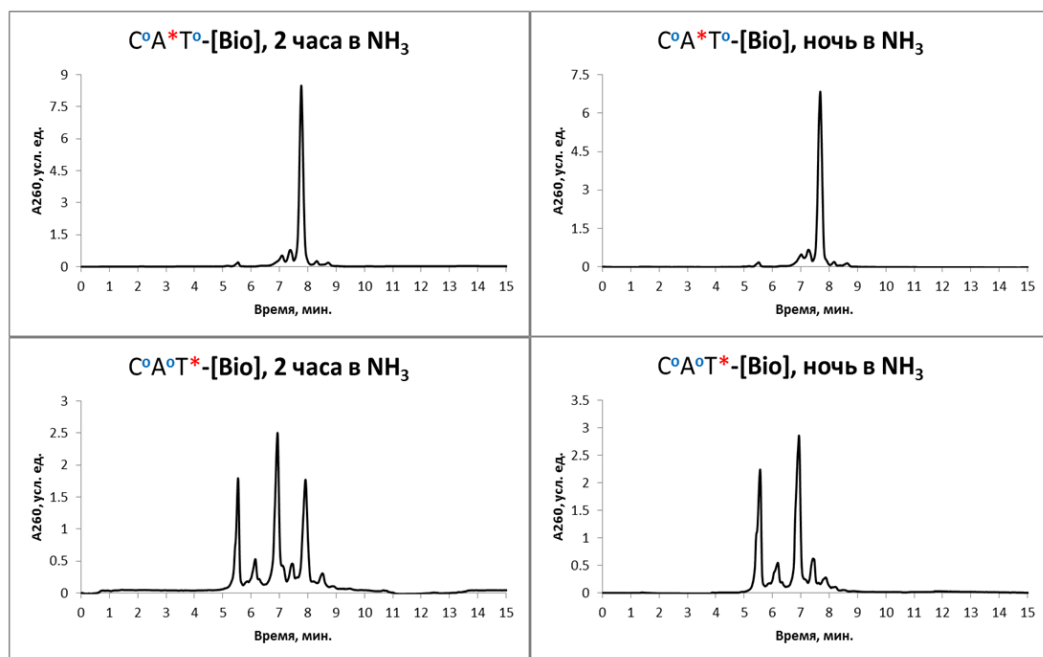


Рисунок 3.17 — Профили ОФХ, полученные после обработки гетеротринуклеотидов $C^{\circ}A^*T^{\circ}-[Bio]$ и $C^{\circ}A^{\circ}T^*-[Bio]$ водным раствором аммиака в течение 2 ч или ночи при $56^{\circ}C$.

Видно, что олигонуклеотид $C^{\circ}A^*T^{\circ}-[Bio]$, в котором ФГ-группа расположена между нуклеотидными звеньями, практически не содержит побочных продуктов: на профиле хроматограммы присутствует один выраженный пик с временем удерживания около 7.8 минут. Профили хроматограмм идентичны

как в случае двухчасовой обработки олигонуклеотида аммиаком, так и в случае обработки в течение ночи. Таким образом, деблокирование $C^{\circ}A^{\circ}T^{\circ}$ -[Bio] происходит без деструкции целевого продукта, как и ожидалось согласно предложенной схеме (рисунок 3.13).

В случае $C^{\circ}A^{\circ}T^{\circ}$ -[Bio] после 2-часовой обработки аммиаком на хроматограмме наблюдаются три сопоставимых по величине пика (рисунок 3.17). Один из них также имеет время удерживания около 7.9 минут, что соответствует полноразмерному продукту синтеза, остальные обладают меньшим временем удерживания. В случае последовательной обработки безводным раствором триэтиламина (для удаления β -цианэтильной защитной группы [109]) и затем аммиаком, профиль хроматограммы в целом не изменялся (данные не приведены). Длительная обработка $C^{\circ}A^{\circ}T^{\circ}$ -[Bio] аммиаком приводила к почти полному исчезновению пика на 7.9 мин. Вероятно, это свидетельствует о том, что само по себе наличие остатка DMI возле атома фосфора благоприятствует внутримолекулярной нуклеофильной атаке гидроксигруппы и дальнейшая деградация циклического эфира происходит необратимо, не приходя к равновесному состоянию. Данный факт накладывает ограничение на химические структуры, в состав которых возможно ввести остаток DMI: непосредственная близость ФГ-группы и заместителей, обладающих нуклеофильными свойствами, может привести к деградации целевого продукта. Например, весьма вероятно, что деградация будет происходить в случае синтеза ФГ-РНК, поскольку 2'-гидроксигруппа рибозы также может атаковать по межнуклеотидному атому фосфора, и введение остатков DMI, по-видимому, будет провоцировать этот процесс.

Таким образом, на примере модельных тринуклеотидов было получено экспериментальное подтверждение того, что непосредственная близость ФГ-группы и нуклеофильных заместителей в структуре олигонуклеотида приводит к разрушению целевого продукта в стандартных условиях деблокирования (обработки водным раствором аммиака). Для точного подтверждения механизма требуются дополнительные эксперименты, поскольку использованные в данной работе методы – масс-спектрометрия и ОФХ – не позволяют судить о конкретных структурных преобразованиях внутри молекулы. Тем не менее, имеющиеся экспериментальные данные согласованно и воспроизводимо указывают на нестабильность ФГ-звена в том случае, если возможна внутримолекулярная нуклеофильная атака по атому фосфора, и подтверждают анхимерное содей-

ствие ОН-группы. Эту особенность необходимо учитывать на стадии дизайна функциональных ОН, содержащих остатки ДМІ в своей структуре, поскольку для 2'-ОМе ФГ-содержащего 26-звенного биотинилированного олигонуклеотида, содержащего такой же этиленгликолевый линкер в составе ненуклеотидного звена, все описанные выше эффекты сохранялись (данные не представлены).

3.3 Исследование субстратных свойств ФГ-олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции (ОТ)

Для сравнения возможности удлинения в различных солевых условиях нативного или ФГ-содержащего праймеров в реакции обратной транскрипции (ОТ) был сконструирован ДНК/РНК субстрат, состоящий из 18-звенной РНК-матрицы гМ и декануклеотидных ДНК-праймеров, представленных в таблице 3. В последовательности РНК-матрицы гМ присутствовал участок (выделен красным цветом), комплементарный последовательности праймера (рисунок 3.18).



Рисунок 3.18 — Схема удлинения декануклеотида серии X по РНК-матрице гМ с образованием флуоресцентного продукта.

Также в нуклеотидной последовательности матрицы предусмотрена только одна позиция А, напротив которой возможно встраивание ферментом флуоресцентно-меченого трифосфата $dUTP^{FAM}$.

Первоначально был осуществлен поиск оптимальных условий реакции ОТ на примере нативного субстрата X/гМ. Была проведена серия экспериментов, в которых варьировали: (1) температуру реакции, (2) количество фермента, концентрации (3) трифосфатов и (4) субстратного ДНК/РНК комплекса. Продукты реакции ОТ разделяли в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) и визуализировали, сканируя сигнал флуоресценции в канале FAM и затем окрашивая этот же гель реактивом «StainsAll». Следует отметить, что окрашивание геля при помощи «StainsAll» позволяет визуализировать все продукты элонгации, включая нефлуоресцентные, а также исходные матрицу и праймер. Флуоресцентный сигнал, в свою очередь, отражает накопление только продуктов реакции ОТ, длина которых не менее 15 нуклеотидов, т.е. содержащих остаток $dUMP^{FAM}$. На рисунке 3.19А и 3.19Б приведён типичный результат анализа реакции ОТ.

Видно, что увеличение концентрации флуоресцентного $dUTP^{FAM}$ при прочих равных условиях (рисунок 3.19, дор. 2 и 3) не влияет на эффективность накопления продуктов элонгации нативного праймера в составе комплекса X/гМ. Напротив, в случае повышения концентрации немеченых $dNTP$ при

постоянной концентрации $dUTP^{FAM}$ (рисунок 3.19А, дор. 3-5) наблюдается снижение доли нефлуоресцентных abortивных продуктов элонгации праймера и, как следствие, увеличение выхода флуоресцентного продукта элонгации. Максимальный выход продукта реакции (согласно сигналу флуоресценции на рисунке 3.19Б) при минимальном количестве abortивных продуктов элонгации наблюдается в дорожке 5.

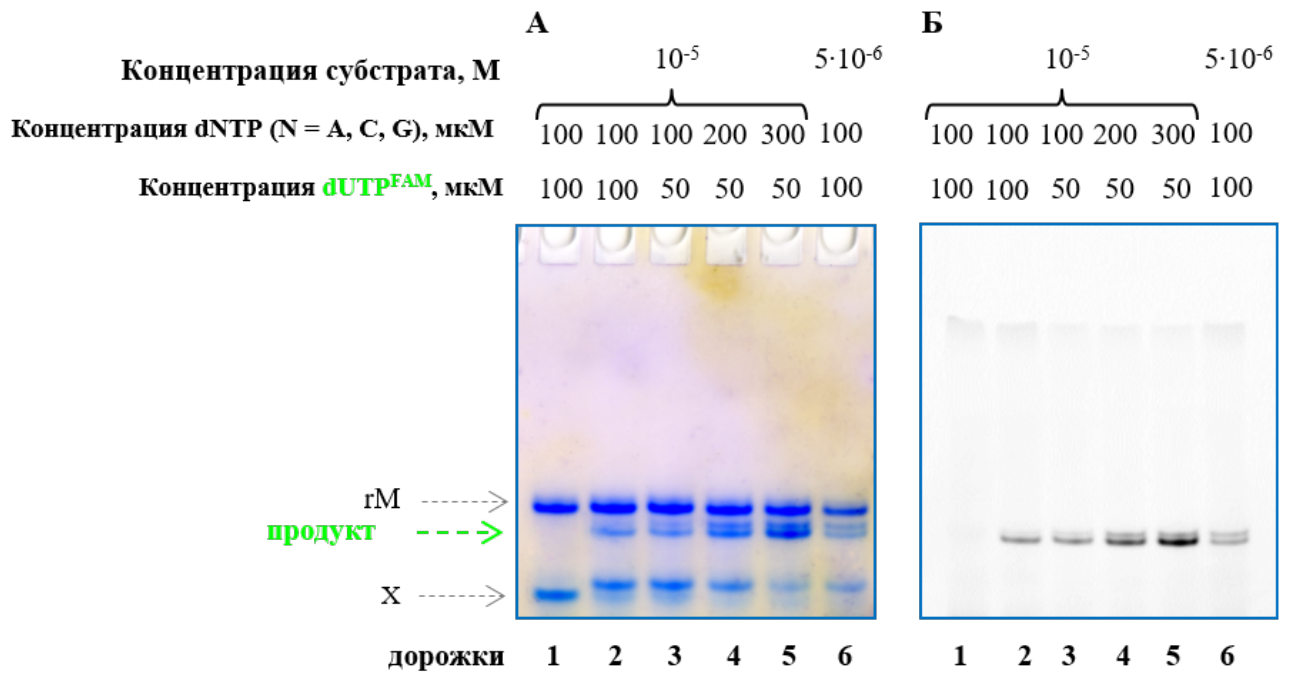


Рисунок 3.19 — Результат электрофоретического разделения продуктов реакций обратной транскрипции для нативного субстрата X/гМ при 37 °С и 200 ед. акт. фермента с различной концентрацией трифосфатов и ДНК/РНК субстрата (указаны на рисунке) в денатурирующем 15% ПААГ после окрашивания реактивом «StainsAll» (А) и сканирования сигнала флуоресценции (Б). Стрелками указаны матрица (гМ), продукт реакции ОТ и нативный декануклеотид (X).

Именно такие условия были использованы в дальнейшем для сравнения эффективности реакции ОТ нативного и ФГ-содержащих праймеров, остов которых был частично или полностью лишён отрицательного заряда. На рисунке 3.20 приведён результат электрофоретического анализа продуктов реакции ОТ, использующих в качестве субстрата комплексы гМ с каждым из декануклеотидов, которые представлены в таблице 3.

Как по данным окрашивания геля «StainsAll» (рисунок 3.20А), так и по данным сигнала флуоресценции (рисунок 3.20Б) можно утверждать, что происходит ферментативное удлинение всех олигонуклеотидов, включая полностью

электронейтральный X_{1-9} . Следует отметить, что степень накопления флуоресцентного продукта несколько снижается при увеличении числа ФГ-групп в составе праймера (рисунок 3.20Б, дор. 11-20). Вероятно, это связано с нарушением электростатических взаимодействий внутри фермент-субстратного комплекса. Тем не менее, полученные данные свидетельствуют о том, что незаряженные ФГО могут являться праймерами в реакции ОТ, что не было ранее описано для полностью модифицированных незаряженных аналогов олигонуклеотидов.

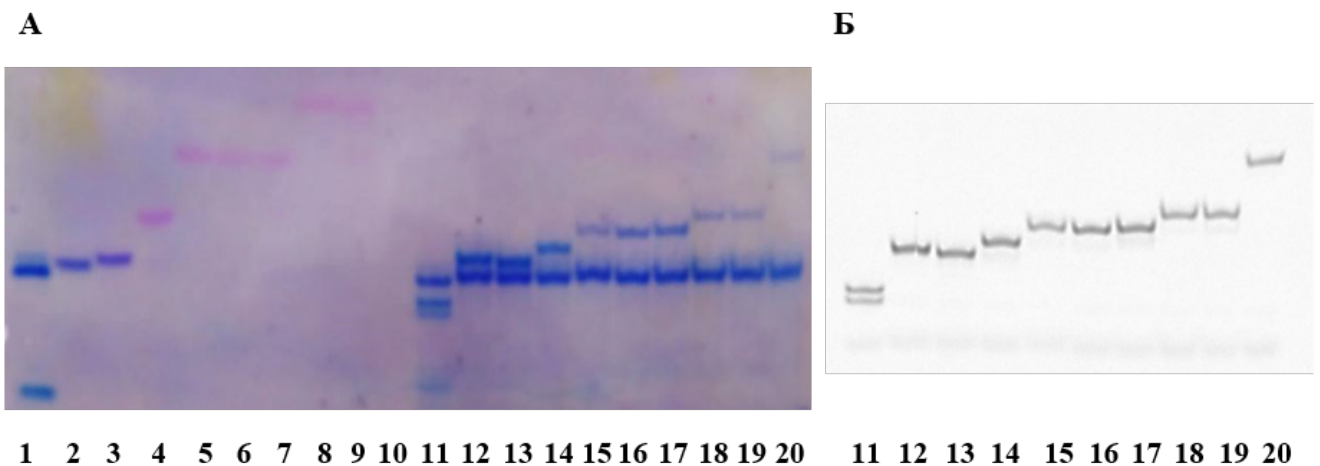


Рисунок 3.20 — Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ в денатурирующем 15% ПААГ после окрашивания реактивом «StainsAll» (А) и сканирования сигнала флуоресценции (Б), где

- дорожки 1-10 – контроли без фермента: смеси гМ и праймера X (дор.1), индивидуальные праймеры $X_{1;4;7}$ (дор. 2), $X_{1;5;9}$ (дор. 3), $X_{2;4;6;8}$ (дор. 4), $X_{1-2;5;8-9}$ (дор. 5), $X_{1;3;5;7;9}$ (дор. 6), $X_{1-2;5-6;9}$ (дор. 7), $X_{1-3;7-9}$ (дор. 8), $X_{2-3;5-6;8-9}$ (дор. 9), X_{1-9} (дор. 10);
- дорожки 11-20 – реакции ОТ с участием праймеров X (дор. 11), $X_{1;4;7}$ (дор. 12), $X_{1;5;9}$ (дор. 13), $X_{2;4;6;8}$ (дор. 14), $X_{1-2;5;8-9}$ (дор. 15), $X_{1;3;5;7;9}$ (дор. 16), $X_{1-2;5-6;9}$ (дор. 17), $X_{1-3;7-9}$ (дор. 18), $X_{2-3;5-6;8-9}$ (дор. 19), X_{1-9} (дор. 20).

Детально проанализировать степень конверсии ФГО-праймеров в случае данной модельной системы не представлялось возможным (рисунок 3.20А, дор. 2-10 и дор. 11-20), поскольку повышение степени модификации ФГО резко снижает эффективность их окрашивания с помощью реактива «StainsAll». Учитывая это обстоятельство, для реализации следующего этапа работы были сконструированы нативные и ФГ-содержащие олигонуклеотиды, несущие на

5'-конце остаток флуоресцеина (таблица 10). Это позволило в дальнейшем детектировать весь спектр продуктов ферментативного превращения праймеров на протяжённой матрице – фрагменте 18S рРНК человека. Структуры праймеров варьировали по степени модификации их углеводо-фосфатного остова относительно 3'-конца. Наряду с нативным праймерами (J1.0 и J2.0), использовали их частично незаряженные аналоги, содержащие 5'-модифицированный и 3'-нативный остов с шестью немодифицированными фосфатными группами (J1.6 и J2.6) и с тремя немодифицированными фосфатными группами (J1.3 и J2.3), а также полностью электронейтральные аналоги (J1.x и J2.x).

Таблица 10 — Структуры праймеров для реакции ОТ с участием высокомолекулярной РНК-матрицы, фрагмента 18S рРНК человека. *[Flu]* – остаток флуоресцеина.

	Последовательность, 5'-3'
J1.0	[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 ^o A ^o C ^o T ^o A
J1.3	[Flu] ^o A [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] T [*] G [*] G [*] T [*] C [*] G [*] G [*] A [*] A ^o C ^o T ^o 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
J2.0	[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 ^o C ^o T ^o C ^o A ^o G ^o T
J2.3	[Flu] ^o C [*] C [*] C [*] T [*] C [*] T [*] T [*] A [*] A [*] T [*] C [*] A [*] T [*] G [*] G [*] C [*] C [*] T [*] C ^o A ^o G ^o 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

Нуклеотидные последовательности данных праймеров были комплементарны участкам фрагмента 18S рРНК человека (протяжённость фрагмента 558 нуклеотидов) (рисунок 3.21).

Первый из двух выбранных участков для гибридизации – J1-серия на рисунке 3.21 – расположен ближе к 3'-концевой области фрагмента рРНК. В процессе ОТ с данного сайта возможно получить продукты, максимальная длина которых должна составлять 439 нуклеотидов. Второй сайт связывания праймеров J2-серии расположен ближе к середине фрагмента рРНК, теоретическая длина полноразмерных продуктов элонгации для данных праймеров составляет 276 нуклеотидов. Сайты связывания олигонуклеотидов со структурированной РНК-матрицей выбирали таким образом, чтобы был возможен

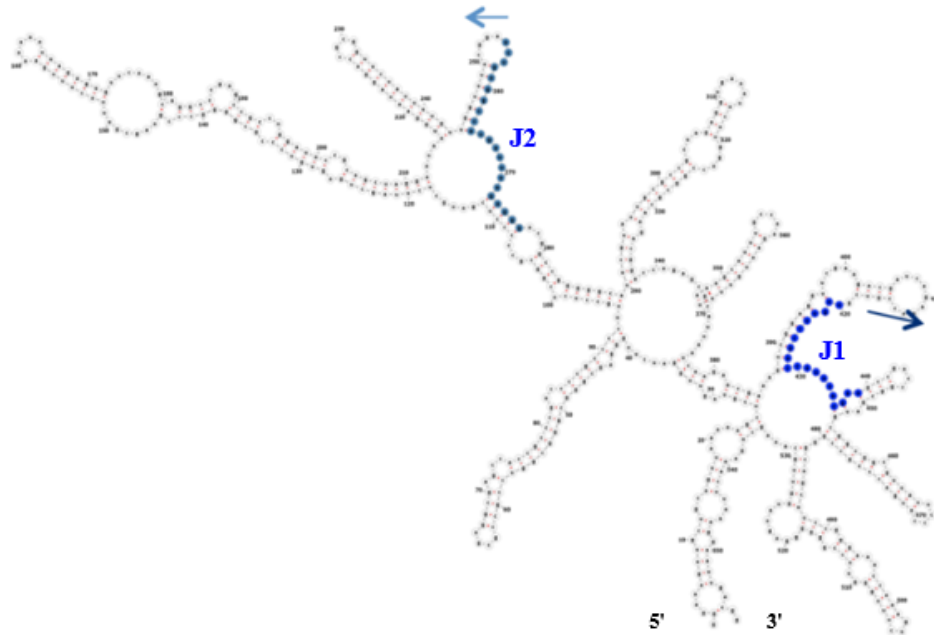


Рисунок 3.21 — Предполагаемая вторичная структура фрагмента 18S рРНК человека, построенная при помощи онлайн-сервиса «RNAfold web server». J1 и J2 – сайты, выбранные для гибридизации праймеров. Стрелками указано направление удлинения праймеров.

отжиг на предположительно одноцепочечный участок матрицы, не образующий внутримолекулярных шпилек. Согласно работе [119], образование нуклеационного комплементарного комплекса с одноцепочечным участком РНК может частично дестабилизировать её вторичную структуру, тем самым способствуя более эффективному отжигу олигонуклеотида.

ФГО, как было показано ранее, обладают способностью образовывать комплементарный комплекс в растворах с ультранизкой ионной силой, поэтому было принципиально сравнить эффективность протекания реакции ОТ для нативного и ФГ-содержащих праймеров в буферных растворах с различающейся ионной силой. Для этого из состава «стандартного» буферного раствора был полностью удален хлорид калия, а концентрация хлорида магния понижена с 5 мМ до 2 мМ. Возможно, понижение ионной силы буферного раствора позволит дестабилизировать внутреннюю вторичную структуру РНК-матрицы и тем самым «облегчить» протекание реакции ОТ. Протяжённые продукты реакции ОТ анализировали методом гель-электрофореза в 1.5% агарозном геле, детектируя продукты удлинения праймера по сигналу флуоресценции и с помощью окрашивания бромистым этидием. Результат электрофоретического разделения продуктов реакции ОТ в буферных растворах со «стандартной» и пониженной ионной силой для праймеров серии J1 приведён на рисунке 3.22.

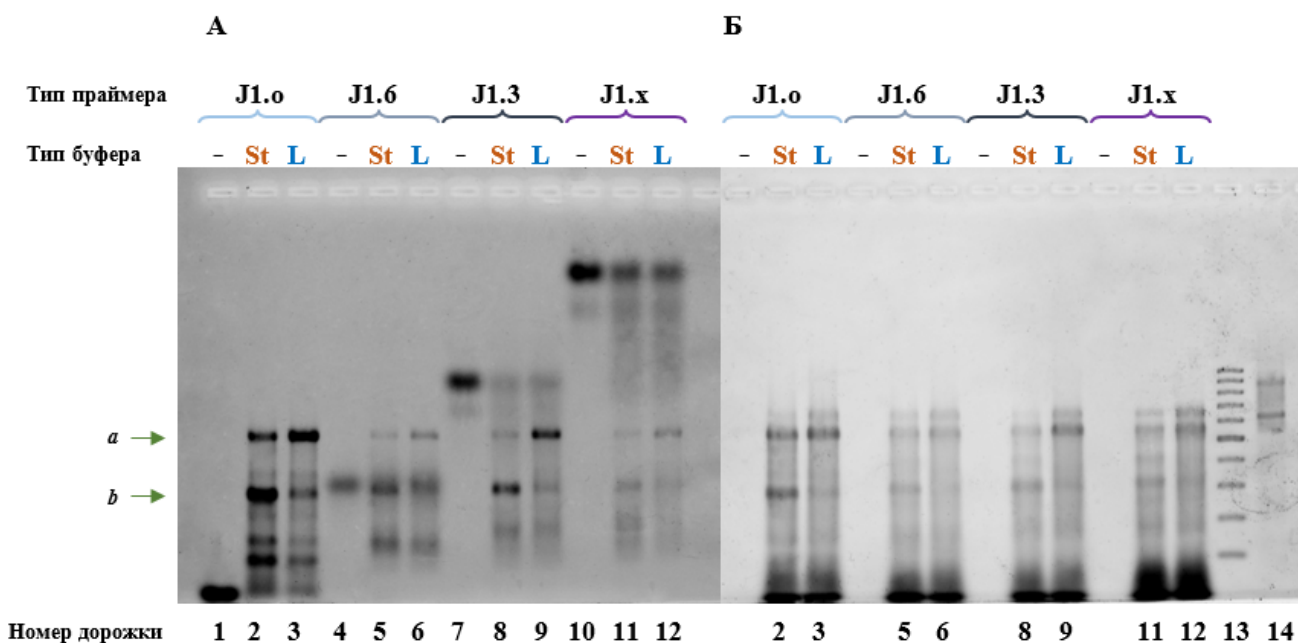


Рисунок 3.22 — Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и бромистого этидия (Б) после разделения в 1.5% агарозном геле:

- индивидуальных ДНК-праймеров J1.o (дор. 1), J1.6 (дор. 4), J1.3 (дор. 7), J1.x (дор. 10), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM;
- продуктов реакции ОТ праймеров J1.o (дор. 2), J1.6 (дор. 5), J1.3 (дор. 8), J1.x (дор. 11) в «стандартных» буферных условиях («St»);
- продуктов реакции ОТ праймеров J1.o (дор. 3), J1.6 (дор. 6), J1.3 (дор. 9), J1.x (дор. 12) в буфере с пониженной ионной силой («L»);
- ДНК-маркера 100-1000 п.о. (дор. 13), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия;
- РНК-матрицы (дор. 14), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия.

Тип праймера и буферных растворов указаны на рисунке, **a** и **b** – соответствуют положениям превалирующих продуктов реакции ОТ.

Видно, что введение ФГ-групп в состав праймера приводит к ожидаемому снижению его электрофоретической подвижности за счёт уменьшения суммарного заряда молекулы (рисунок 3.22А, дор. 1, 4, 7, 10). Ферментативная элонгация праймера наблюдается во всех случаях, даже для праймера J1.x, обладающего полностью электронейтральным углеводо-фосфатным остовом (рисунок 3.22А, дор. 11, 12).

На примере нативного праймера J1.o рассмотрим общий состав реакционной смеси, полученной в результате ОТ (рисунок 3.22, дор. 1-3). Исходный праймер J1.o (дор. 1) практически отсутствует среди продуктов реакции ОТ (дор. 2 и 3), что свидетельствует об эффективном протекании реакции. Тем не

менее, продукты элонгации праймера достаточно разнородны по своей электрофоретической подвижности. Отсутствие стадии гидролиза РНК-матрицы перед проведением гель-электрофореза реакционных смесей не оказывало влияния на распределение флуоресцентных продуктов элонгации в геле (данные не приведены). Вероятно, продукты реакции с различной электрофоретической подвижностью соответствуют продуктам элонгации разной длины. Вероятно, наличие abortивных продуктов элонгации связано с высокой степенью структурированности РНК-матрицы, поскольку ревертаза, не обладая хеликазной активностью, не способна преодолеть шпильки РНК или другие вторичные структуры, что может привести к диссоциации комплекса фермента и ДНК-РНК субстрата [120]. Как следствие, снижается ожидаемая процессивность реакции ОТ. В рассматриваемых реакционных смесях (рисунок 3.22, дор. 2 и 3) можно выделить два превалирующих продукта (**a** и **b**). Электрофоретическая подвижность продукта **a** сопоставима с подвижностью исходной РНК-матрицы (рисунок 3.22Б, дор. 14), длина которой 558 нуклеотидов, и с положением полос в ДНК-маркере (рисунок 3.22Б, дор. 13), соответствующим длинам 500 и 600 пар оснований. Можно полагать, что данный продукт по своей длине близок к полноразмерному теоретическому. Продукт **b** обладает меньшей электрофоретической подвижностью, приблизительно соответствующей подвижности 300 пар оснований дцДНК-маркера. Даже введение дополнительной стадии денатурации рРНК при 95 °С для уменьшения ее структурирования не привело к увеличению выхода продукта **a** (данные не представлены).

Интересно, что электрофоретическая подвижность исходных праймеров J1.6, J1.3 и J1.x (рисунок 3.22А, дор. 4, 7, 10) ниже, чем у продуктов их удлинения в реакции ОТ (рисунок 3.22А, 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 олигонуклеотида 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 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, протяжённые продукты реакции ОТ для ФГ-содержащих праймеров демонстрируют «классическое» поведение в геле, замедляясь при увеличении размера молекулы. Вклад отно-

сительно небольшого числа ФГ-групп в этом случае становится незначителен. Благодаря этому, вероятно, электрофоретическая подвижность наиболее представленных продуктов реакции ОТ (**a** и **b**) практически не зависит от числа модификаций в исходном ФГ-содержащем праймере.

Понижение ионной силы реакционного буфера (рисунок 3.22, дор. 3, 6, 9, 12) приводит к накоплению более длинных продуктов **a** реакции ОТ по сравнению со стандартными реакционными условиями (рисунок 3.22, дор. 2, 5, 8, 11) вне зависимости от наличия модификаций в составе праймера. Наиболее выражено изменение ионной силы повлияло на соотношение продуктов элонгации нативного праймера J1.o: согласно интенсивностям сигнала флуоресценции относительное содержание наиболее протяжённого продукта **a** выросло втрое (с 9 до 27%), в то время как содержание abortивного продукта **b** уменьшилось (с 26 до 10%) при понижении ионной силы буферного раствора (рисунок 3.23). Вероятно, удаление части солей из состава буфера позволило дестабилизировать внутреннюю структуру РНК, но не оказало значительного влияния на формирование тройного комплекса «ДНК-РНК-фермент». Для модифицированных ФГ-содержащих праймеров перераспределение продуктов элонгации при смене буферного раствора также наблюдалось, но на уровне нескольких процентов.

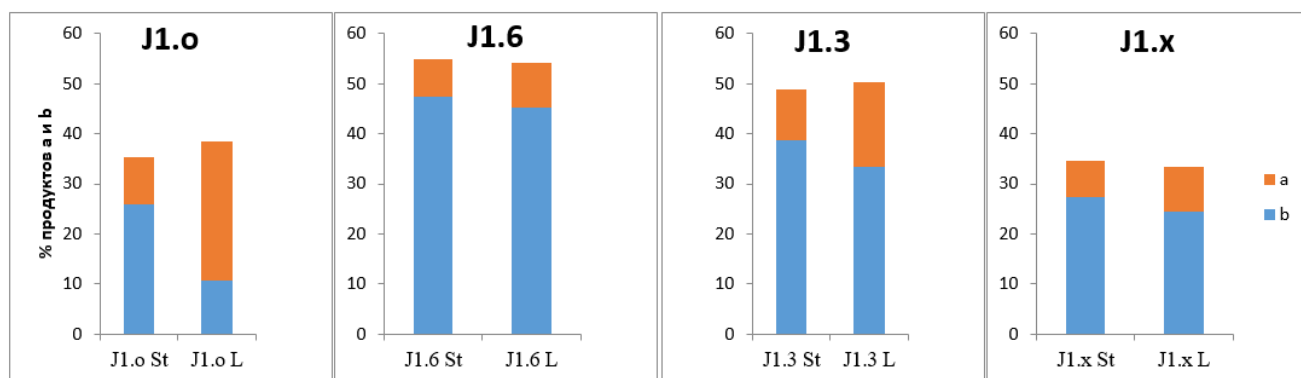


Рисунок 3.23 — Относительное содержание основных продуктов элонгации праймеров серии J1, **a** и **b**, образующихся в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» («St») и пониженной («L») ионной силой.

Следует отметить, что для полностью электронейтрального ФГО J1.x (рисунок 3.22А дор. 10, 11 и 12) наблюдается меньшая конверсия в реакции ОТ относительно нативного праймера (рисунок 3.22А дор. 1, 2 и 3). Можно предположить, что отсутствие заряженных фосфодиэфирных групп дестабилизирует фермент-субстратный комплекс или нарушает его пространственную организацию на этапах инициации или транслокации (по аналогии с работой [49; 121]).

Также можно предположить, что не все стерические формы незаряженного ФГ-праймера, возникающие вследствие хиральности ФГ-групп, являются «подходящими» для образования каталитически активного фермент-субстратного комплекса.

Аналогичные результаты были получены для праймеров серии J2 (рисунок 3.24).

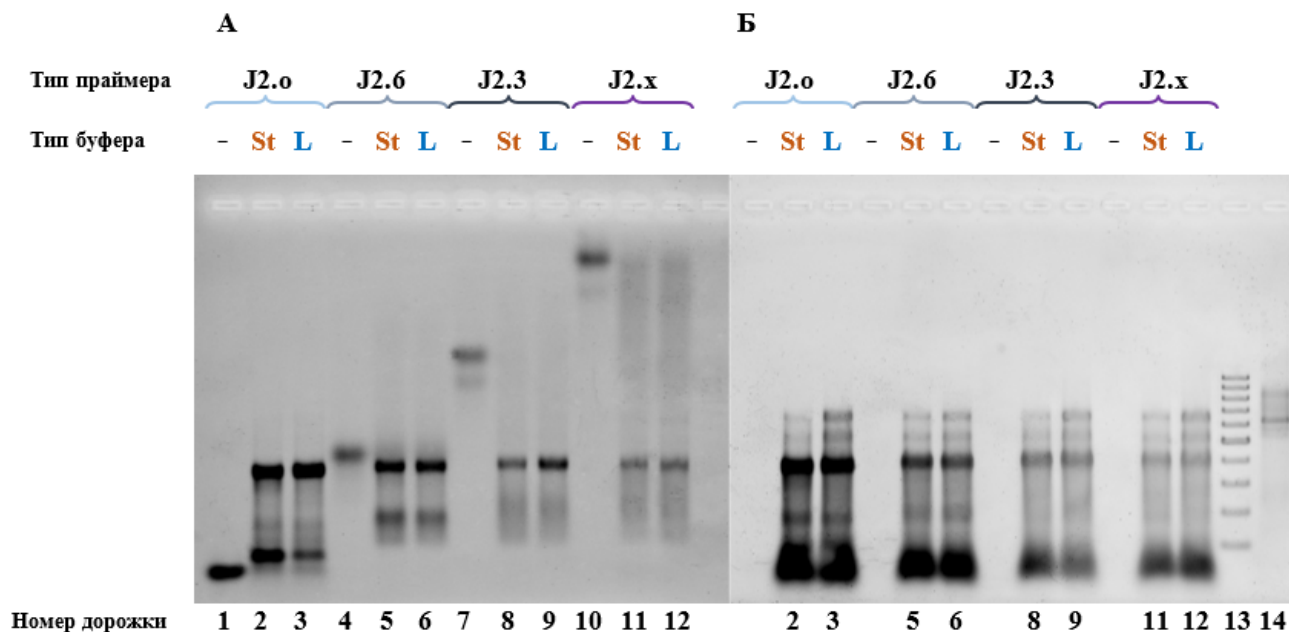


Рисунок 3.24 — Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и бромистого этидия (Б) после разделения в 1.5% агарозном геле:

- индивидуальных ДНК-праймеров J2.o (дор. 1), J2.6 (дор. 4), J2.3 (дор. 7), J2.x (дор. 10), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM;
- продуктов реакции ОТ праймеров J2.o (дор. 2), J2.6 (дор. 5), J2.3 (дор. 8), J2.x (дор. 11) в «стандартных» буферных условиях («St»);
- продуктов реакции ОТ праймеров J2.o (дор. 3), J2.6 (дор. 6), J2.3 (дор. 9), J2.x (дор. 12) в буфере с пониженной ионной силой («L»);
- ДНК-маркера 100-1000 п.о. (дор. 13), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия;
- РНК-матрицы (дор. 14), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия.

Тип праймера и буферных растворов указаны на рисунке.

В данном случае среди продуктов удлинения праймера наблюдается меньшее количество abortивных продуктов. Вероятнее всего, это связано с тем, что теоретическая максимальная длина продуктов элонгации меньше, чем в случае праймера J1, и в ходе элонгации преодолевается меньшее количество шпилек

или других структурных элементов РНК-матрицы, из-за чего процессивность работы фермента оказывается выше.

Основной продукт элонгации праймеров серии J2 обладает электрофоретической подвижностью, сопоставимой с подвижностью двуцепочечного ДНК-маркера длиной 400 пар оснований. Предположительно, данный продукт близок по длине к полноразмерному (276 нукл. для данного праймера). Его относительное содержание в реакционных смесях представлено на рисунке 3.25. Как и для праймеров серии J1, более эффективное накопление продукта наблюдается в буферном растворе с пониженной ионной силой («L») для нативного праймера J2.o (увеличение доли основного продукта с 45 до 61%) и для ФГ-праймера J2.3 (с 33 до 46%). Интересно, что изменение ионной силы буферного раствора оказало влияние на эффективность элонгации лишь некоторых ФГ-праймеров. Возможно, расположение ФГ-групп в активном центре фермента оказывает влияние на конформацию фермент-субстратного комплекса и, как следствие, на его чувствительность к ионному составу среды и сольватации.

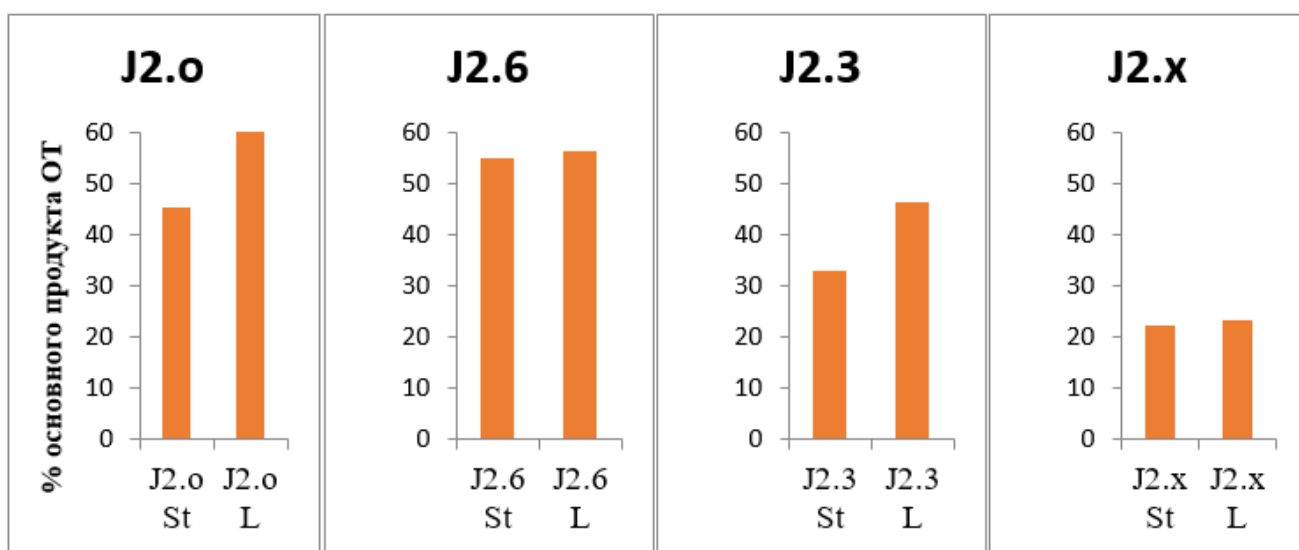


Рисунок 3.25 — Относительное содержание основного продукта элонгации праймеров серии J2, образующегося в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» («St») и пониженной («L») ионной силой.

Аналогичные эксперименты были проведены с использованием рекомбинантной обратной транскриптазы вируса HIV-1 («Abcam», США), однако накопление продуктов элонгации ДНК-праймеров было менее выраженным. 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.

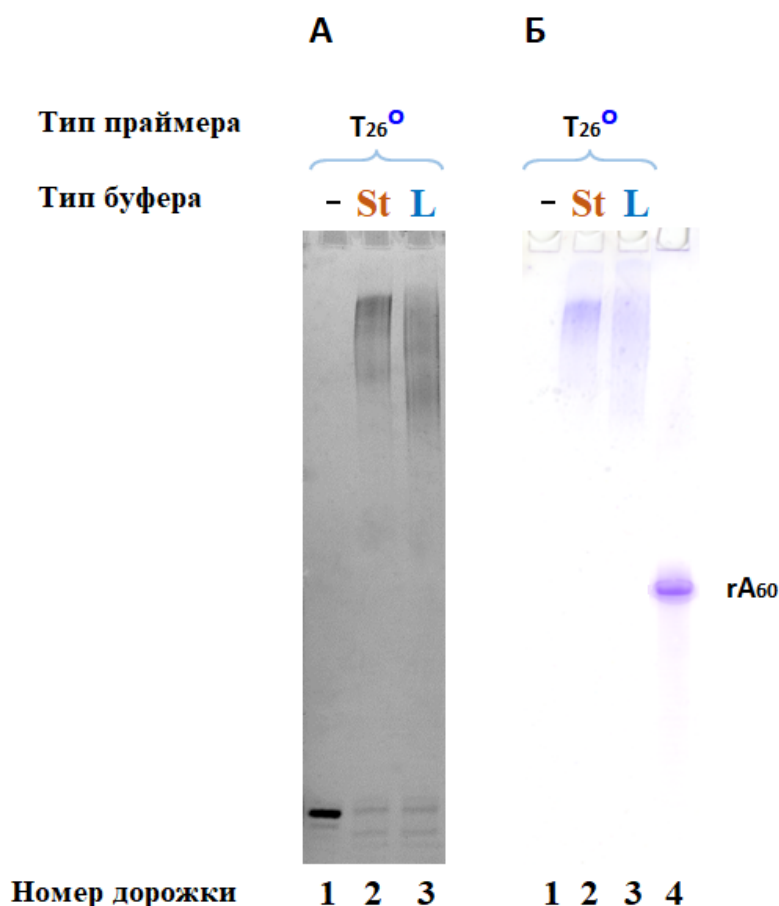


Рисунок 3.26 — Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и окрашивания реактивом «StainsAll» (Б) после разделения в 15% денатурирующем ПААГ продуктов реакции ОТ для гомополимерного субстрата T₂₆^o/rA₆₀, где дор. 1 – индивидуальный T₂₆^o, дор. 2 и 3 – продукты реакции ОТ в буфере со стандартной и пониженной ионной силой соответственно, дор. 4 – индивидуальная РНК-матрица rA₆₀, которая видна только при окрашивании реактивом «StainsAll».

«лишних» нуклеотидных звеньев в состав синтезируемой кДНК – вследствие способности обратной транскриптазы к (1) безматричному синтезу, (2) синтезу со сменой матричной цепи. Однако при безматричном синтезе фермент достраивает, как правило, лишь несколько нуклеотидных звеньев (от 1 до 8 согласно литературным данным [124]). Включение такого количества «дополнительных» нуклеотидов не могло привести к настолько разительному отличию в электрофоретической подвижности rA₆₀ и полученных продуктов удлинения праймера dT₂₆.

Второй возможный механизм – синтез со сменой матричной цепи – является частным случаем различных явлений «перестройки» ДНК/РНК субстрата,

то есть внутри- или межмолекулярных переносов НК-компонентов друг относительно друга. Конкретный путь реализации явления переноса во многом зависит от нуклеотидной последовательности субстрата: например, для смены матричной цепи необходима частичная комплементарность 3'-концевых областей ДНК-праймера и РНК-матрицы. В то же время для гомополимерных субстратов возможен и другой вариант «перестройки» – понуклеотидное смещение, «проскальзывание» ДНК-цепи вдоль одной и той же РНК-матрицы. Чтобы прояснить, какой механизм с большей вероятностью реализуется для субстратов, содержащих лишь комплементарные гА/дТ пары, были проведены дополнительные эксперименты на примере «тупоконечного» нативного комплекса гА₂₆/дТ₂₆[○]. При постановке реакций ОТ с участием этого субстрата использовали стандартные буферные условия и варьировали два параметра: соотношение концентраций РНК и ДНК в реакционной смеси (1:10, 1:1, 10:1) и количество фермента MMLV Н- (50, 100, 200 или 400 е.а.). Поскольку в 15% ПААГ более надёжно различаются продукты умеренных длин (до 100 нуклеотидов), время реакции ОТ сократили до 5 минут с целью снизить конверсию исходного ДНК-праймера в «сверх-длинные» продукты элонгации. Инактивацию реакции осуществляли путем кратковременного (5 минут) нагрева реакционной смеси до 90 °С, не проводя щелочной гидролиз РНК-матрицы. Результаты электрофоретического анализа реакций ОТ приведены на рисунке 3.27.

Видно, что при изменении соотношения концентраций РНК-матрицы и ДНК-праймера значительно видоизменяется как эффективность элонгации праймера, так и механизм этого процесса. В том случае, если РНК находится в десятикратном избытке по сравнению с ДНК (3.27, дор. 11-15), наблюдается, по-видимому, механизм со сменой матричной цепи: 3'-конец синтезированной кДНК отжигается на свободную матричную цепь, за счёт чего элонгация продолжается. Таким образом, праймер дТ₂₆[○] удлиняется с образованием дискретного набора продуктов, длина которых, вероятно, с хорошей точностью кратна длине матрицы гА₂₆.

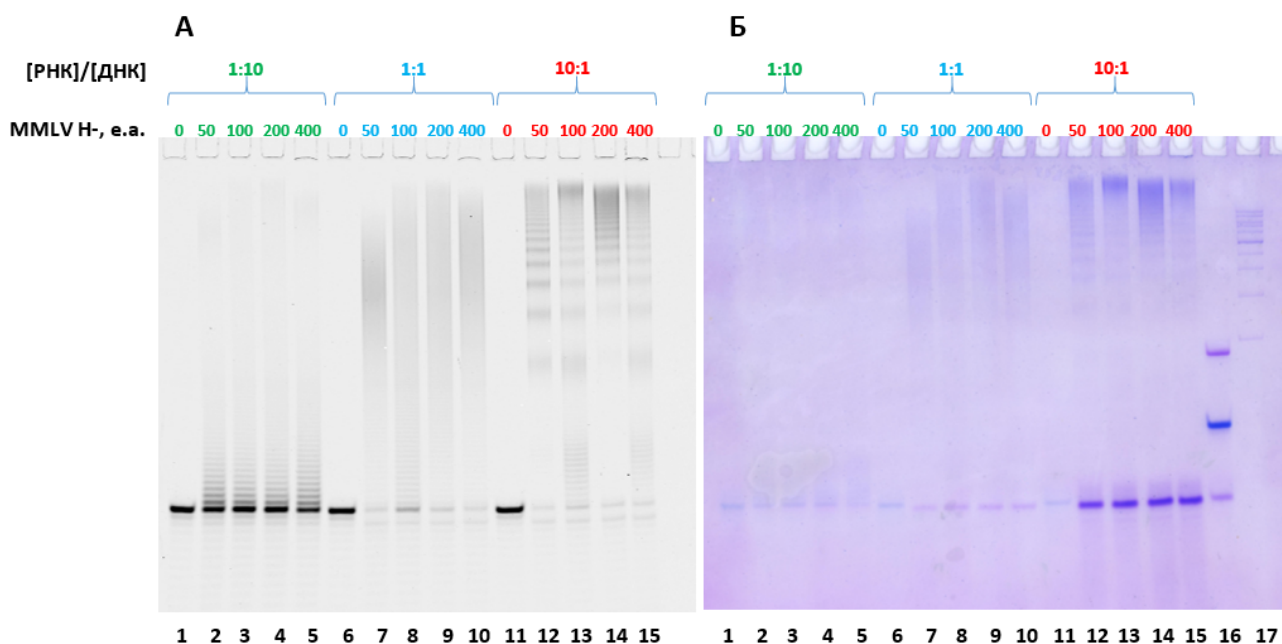


Рисунок 3.27 — Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и окрашивания реактивом «StainsAll» (Б) после разделения продуктов реакции

ОТ с участием тупоконечного субстрата rA_{26}/dT_{26}° в 15% денат. ПААГ:

- дор. 1-5 – реакции в условиях 10-кр. недостатка РНК-цепи;
- дор. 6-10 – реакции в условиях эквимольного содержания РНК и ДНК;
- дор. 11-15 – реакция в условиях 10-кр. избытка РНК цепи;
- дор. 16 – смесь олигонуклеотидов rA_{26} , dT_{40} и rA_{60} , которая видна только при окрашивании геля реактивом «StainsAll»;
- дор. 17 – двуцепочечный ДНК-маркер длиной 100-1000 пар оснований, который виден только при окрашивании геля реактивом «StainsAll».

Использованное количество фермента (от 0 до 400 е.а.) указано на рисунке.

Если же РНК-матрица и ДНК-праймер использованы в эквимольном количестве (3.27, дор. 6-10), также можно наблюдать практически количественную конверсию исходного праймера в высокомолекулярные продукты, однако их распределение по длине совершенно иное: наблюдается плавный, непрерывный рост длины продукта. Весьма вероятно, что в данном случае реализуется синтез через «проскальзывание». Также можно предположить, что реализуется безматричный синтез, однако это противоречит литературным данным, согласно которым ревертаза MMLV достраивает лишь несколько (2-8) нуклеотидных звеньев [86; 124].

10-кратный недостаток РНК-матрицы (3.27, дор. 1-5) приводит к подавлению элонгации праймера в целом. Механизм реакции со сменой матричной

цепи в данном случае маловероятен, так как РНК-цепь находится в комплексе с избытком ДНК-праймера. Можно предположить, что в данном случае реализовался синтез через «проскальзывание» или безматричный синтез, но на фоне избытка исходного флуоресцирующего праймера продукты элонгации видны хуже.

Зависимость протекания реакции ОТ от количества фермента различается для рассматриваемых реакционных смесей: в случае эквимольного содержания РНК и ДНК цепей (дор. 7-10) оптимальное количество фермента около 200 е.а., при отклонении количества в сторону как больших, так и меньших значений, реакция протекает, по-видимому, медленнее. В случае 10-кратного избытка РНК-цепи (дор. 12-15) оптимум содержания фермента в реакционной смеси, по-видимому, тоже около 200 е.а., но снижение количества фермента не обязательно приводит к заметному снижению эффективности реакции.

Для того, чтобы подтвердить различие между наблюдаемыми режимами работы фермента, была рассмотрена ещё одна РНК-матрица с «блочной» последовательностью 5'-г(UCG UCG AAA AAA AAA AAA AAA CUA GA)-3'. Её нуклеотидная последовательность предусматривает гомополимерный гА-тракт длиной 15 нуклеотидов, «заключённый» между двумя гетеронуклеотидными участками. Эти участки выбраны таким образом, чтобы 3'-концевой участок синтезированной кДНК не был комплементарен РНК-матрице. Это должно, по крайней мере, значительно затруднить реализацию смены матричной цепи или, возможно, «запретить» её полностью.

В качестве ДНК-праймера снова использовали нативный dT_{26}° . Реакцию проводили, варьируя соотношение ДНК- и РНК-цепей (аналогично предыдущему эксперименту) и время реакции (5, 10, 20, 60 минут). Количество фермента в данном случае зафиксировали (200 е.а.). Результаты реакций ОТ с использованием «блочной» РНК-матрицы 5'-г(UCG UCG AAA AAA AAA AAA AAA CUA GA)-3' и праймера dT_{26}° приведены на рисунке 3.28.

Видно, что, в отличие от предыдущего эксперимента с гомополимерной матрицей gA_{26} (рисунок 3.27, дор. 14), даже при 10-кратном избытке «блочной» РНК-матрицы (рисунок 3.28, дор. 12-15) наблюдается плавное увеличение длины синтезируемой кДНК, без явного превалирования отдельных, дискретных наборов продуктов.

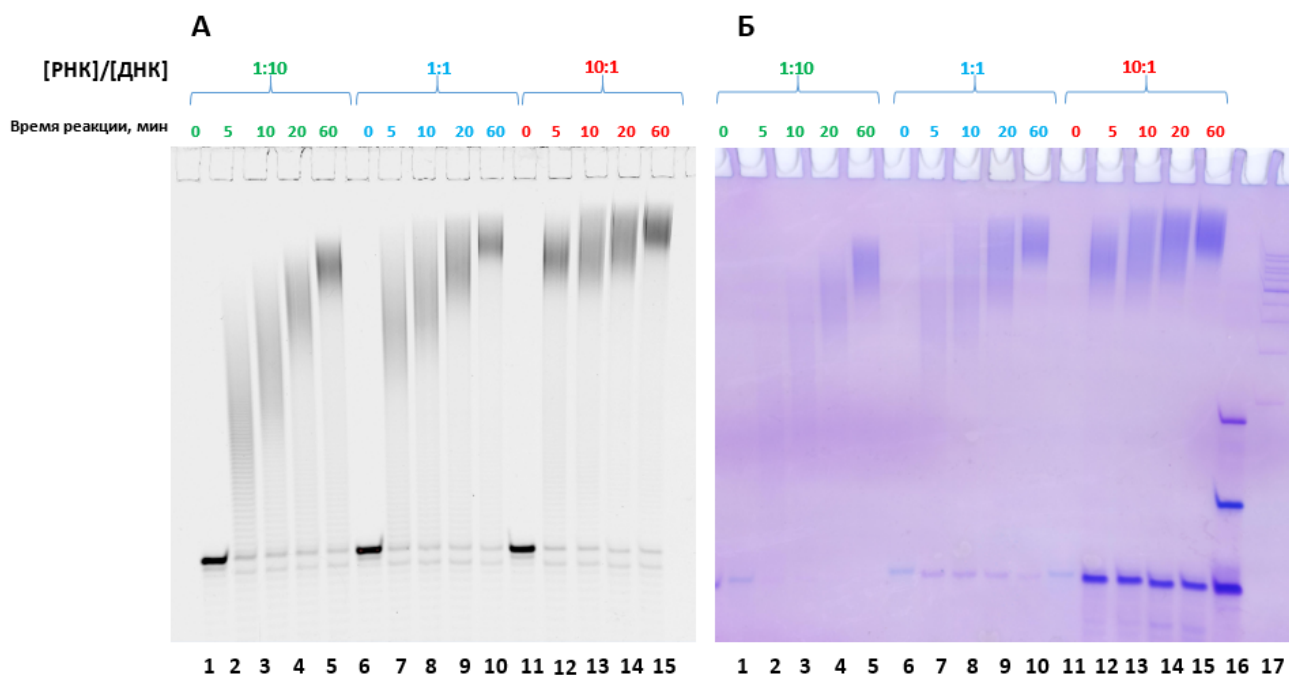


Рисунок 3.28 — Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и окрашивания реактивом «StainsAll» (Б) после разделения продуктов реакции ОТ с участием dT_{26}° и «блочной» РНК-матрицы в 15% денатурирующем ПААГ:

- дор. 1-5 – реакции в условиях 10-кр. недостатка РНК-цепи;
- дор. 6-10 – реакции в условиях эквимольного содержания РНК и ДНК;
- дор. 11-15 – реакция в условиях 10-кр. избытка РНК цепи;
- дор. 16 – смесь олигонуклеотидов rA_{26} , dT_{40} и rA_{60} , которая видна только при окрашивании геля реактивом «StainsAll»;
- дор. 17 – двуцепочечный ДНК-маркер длиной 100-1000 пар оснований, который виден только при окрашивании геля реактивом «StainsAll».

Время реакции (от 0 до 60 минут) указано на рисунке. Количество фермента фиксировано (200 е.а.).

По-видимому, отсутствие комплементарности между 3'-концевым гетеронуклеотидным участком РНК и синтезируемой поли(dT)-цепью действительно значительно затруднило или полностью исключило возможность смены матричной цепи. Как следствие, наблюдается непрерывное наращивание праймера путём «проскальзывания» по rA -тракту, поскольку в реакционной смеси содержится единственный дезоксирибонуклеозидтрифосфат – $dTTP$. В случае, если провести реакцию ОТ с участием данного субстрата и полного набора трифосфатов, произойдёт ожидаемое удлинение праймера по гетерополимерному участку матрицы практически без образования «сверх-удлинённых» продуктов элонгации (данные не приведены). Вероятно, это свидетельствует о том,

что синтез через «проскальзывание» реализуется именно для АТ-богатых, легкоплавких ДНК/РНК субстратов, обладающих большей конформационной лабильностью.

Примечательно, что ФГ-аналоги данного праймера – $T_{13}^{\circ}T_{13}^*$ и T_{26}^* , – по-видимому, также способны участвовать в процессе элонгации через «проскальзывание», однако со значительно меньшей эффективностью. Об этом свидетельствует низкая конверсия исходных ФГ-праймеров в «сверх-удлинённые» продукты на рисунке 3.29 (дор. 5-6, 8-9) по сравнению с нативным вариантом (дор. 2-3). Таким образом, можно предположить, что введение ФГ-модификаций может влиять на эффективность перестроек НК-субстрата. Причиной тому может являться повышение термодинамической стабильности НК-комплекса при введении ФГ-групп и/или изменение конформации фермент-субстратного комплекса в целом. Для того, чтобы более детально проследить влияние ФГ-групп на эффективность полимеризации и вероятность «проскальзывания», требуется значительно расширить рассматриваемую библиотеку химерных ФГО с целью установить ключевые взаимодействия НК-субстрата и аминокислотных остатков в активном центре фермента.

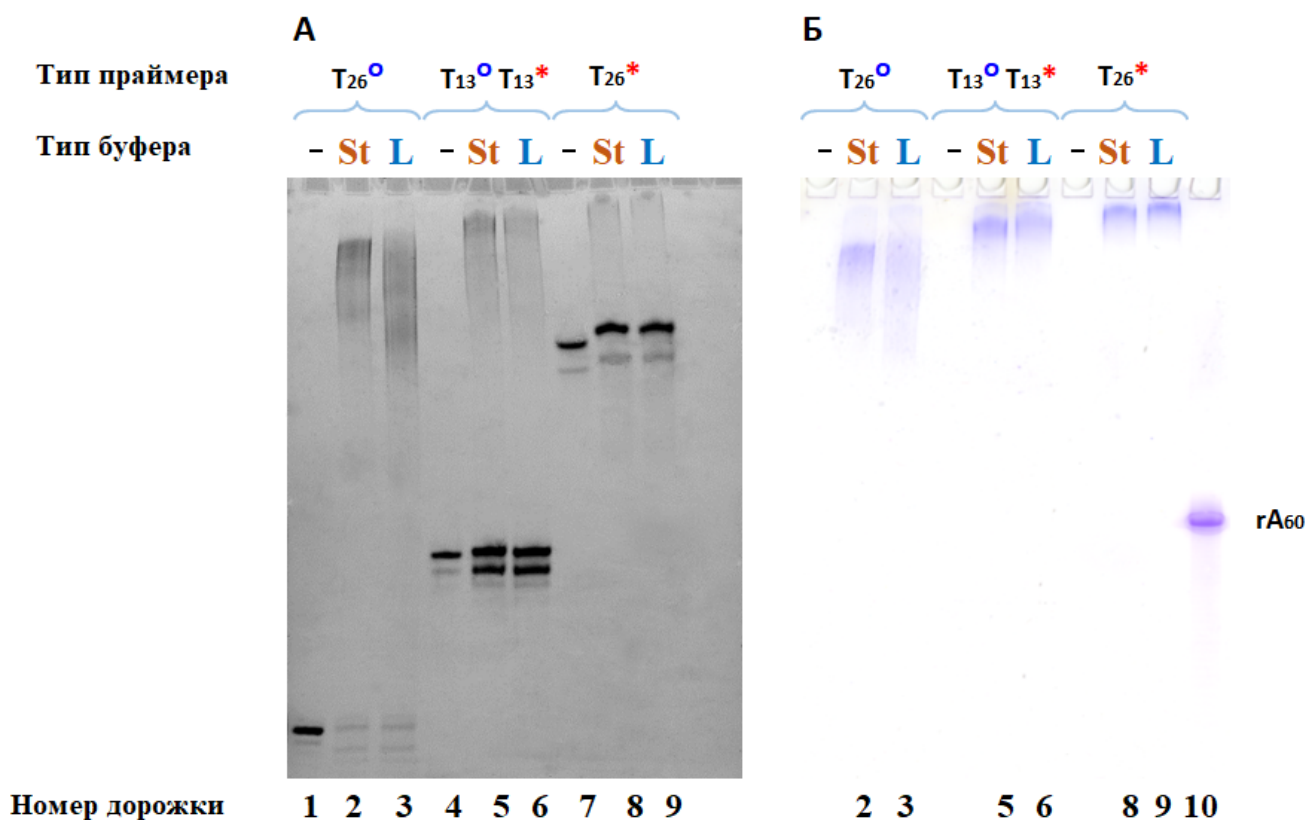


Рисунок 3.29 — Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и окрашивания реактивом «StainsAll» (Б) после разделения в 15% денат. ПААГ: - индивидуальных ДНК-праймеров T₂₆[○] (дор. 1), T₁₃[○]T₁₃^{*} (дор. 4), T₂₆^{*} (дор. 7); - продуктов удлинения праймеров T₂₆[○] (дор. 2), T₁₃[○]T₁₃^{*} (дор. 5), T₂₆^{*} (дор. 8) в реакции ОТ в «стандартных» буферных условиях («St»); - продуктов удлинения праймеров T₂₆[○] (дор. 3), T₁₃[○]T₁₃^{*} (дор. 6), T₂₆^{*} (дор. 9) в реакции ОТ в буфере с пониженной ионной силой («L»); - индивидуальной РНК-матрицы rA₆₀ (дор. 10).

3.4 Иммунизация ФГО на поверхности

Ещё одно важное применение олигонуклеотидов для анализа различных НК – разработка систем обнаружения и «выхватывания» исследуемых НК из клеточного экстракта, то есть систем для деплеции НК. Это особенно важно для обнаружения и исследования низкокопийных РНК (матричных, малых интерферирующих, некодирующих и др.), так как для их амплификации или секвенирования необходимо отделить их от других, гораздо более представленных РНК клетки (тРНК, рРНК). Большинство подходов к РНК-деплеции,

получивших распространение в лабораторных исследованиях и реализацию в виде коммерческих наборов, подразумевают предварительную иммобилизацию ON-зонда на поверхности частицы, инкубирование полученной фазы с НК-мишенью и перенос целевой РНК, связанной с зондом в комплементарный дуплекс, для дальнейшей амплификации. Эффективность «выхватывания» целевой РНК, несомненно, будет зависеть от гибридизационной способности используемого зонда и «доступности» участка РНК, выбранного для связывания с зондом. Использование зондов, содержащих незаряженный остов, может позволить усилить комплементарное связывание с РНК-мишенью и, более того, провести гибридизацию в средах с пониженной ионной силой, в которых внутренние вторичные структуры целевой РНК оказались бы дестабилизированы [75].

Для иммобилизации ФГО были рассмотрены два варианта поверхности, различные по своей природе:

- полимерный носитель для олигонуклеотидного синтеза на основе полистирола, содержащий амидную связь с первым (3'-концевым) нуклеотидным звеном. Данная амидная связь не гидролизует на этапе деблокирования ON, 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. Для этого полистирольные частицы с иммобилизованным dT-звеном (далее обозначены «псТ») деблокировали для удаления тритильной защиты, BrCN активированную сефарозу промыли согласно рекомендациям производителя и инактивировали путём гидролиза -OCN групп гидроксидом натрия. Затем каждый из полученных типов частиц инкубировали со смесью гетерополимерных ДНК 5'-GCGCCAAACA-3' и РНК 5'-r(GUAUUUCUGUUUGGCGCG)-3' либо в деионизованной воде, либо в стандартном буферном растворе для ОТ («St»). Супернатанты переносили и анализировали в 15% денатурирующем ПААГ (рисунк 3.30).

Видно, что неспецифическая сорбция НК наблюдается в случае полистирольных частиц псТ (дор. 5-6), о чём свидетельствует утеря олигонук-

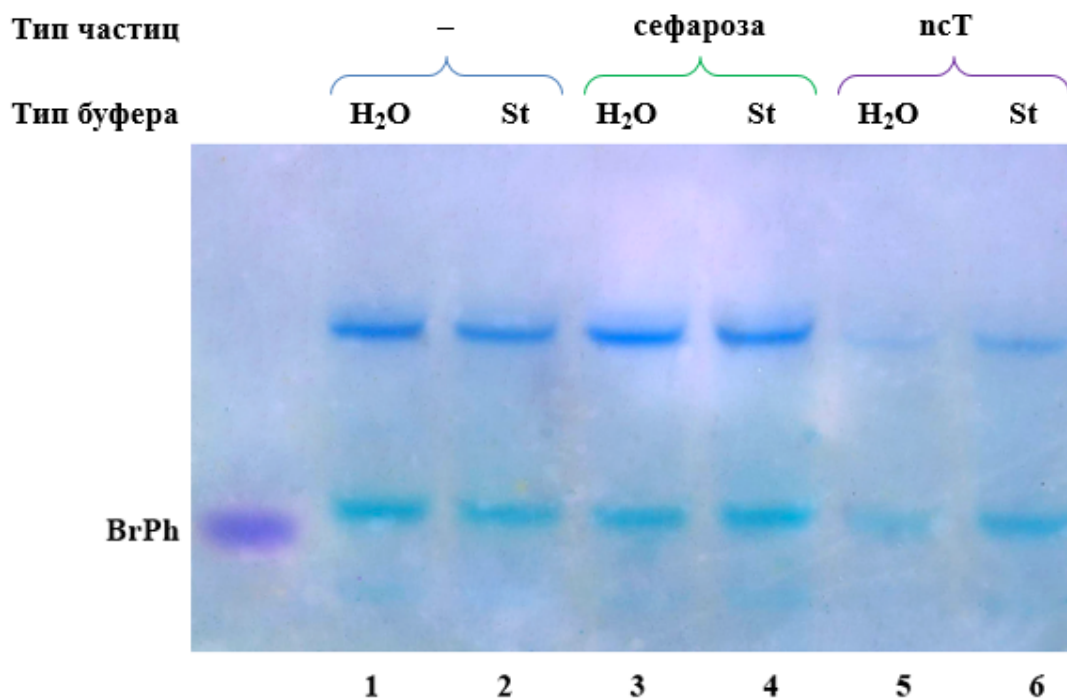


Рисунок 3.30 — Результат электрофоретического анализа в 15% денат. ПААГ растворов ON – смеси ДНК 5'-GCGCCAAACA-3' и РНК 5'-r(GUAUUUCUGUUUGGCGCG)-3' – после инкубации с частицами, не содержащими зонда:

- дор. 1-2 – контрольные растворы ON в воде (H₂O) и буферном растворе (St);
- дор. 3-4 – супернатанты после инкубации с инактивированной сефарозой в воде (H₂O) и буферном растворе (St);
- дор. 5-6 – супернатанты после инкубации с полистирольными частицами (псТ) в воде (H₂O) и буферном растворе (St);

Гель окрашен реактивом «StainsAll». BrPh – краситель бромфеноловый синий.

леотидного материала по сравнению с контрольными растворами ON, не контактировавшими с фазой (дор. 1-2). Предположительно, сорбция на частицы псТ происходит вследствие гидрофобных взаимодействий поверхности и ON. Для ослабления гидрофобных взаимодействий возможно использовать дополнительные агенты – поверхностно-активные вещества, детергенты, – однако их присутствие может усложнить дальнейшую очистку целевой НК-мишени. 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, в дальнейшем использовали частицы сефарозы в качестве носителя для ДНК-зондов.

Для покрытия частиц BrCN активированной сефарозы олигонуклеотидными зондами были синтезированы и очищены нативные и ФГ-олигонуклеотиды J1^o, J1^{*}, J2^o, J2^{*}, содержащие 5'-концевую ненуклеотидную вставку, несущую аминогруппу. Также были синтезированы комплементарные ДНК-мишени MJ1 и MJ2, а так же РНК-мишень rJ2, содержащие остаток флуоресцеина (таблица 12).

Таблица 12 — Структуры зондов для иммобилизации на частицы BrCN активированной сефарозы и комплементарных флуоресцентно-меченых НК-мишеней. [Flu] – остаток флуоресцеина. [NH₂] – ненуклеотидная 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	TAGTTCCGACCATAAACGAT-[Flu]
MJ2	ACTGAGGCCATGATTAAGAGGG-[Flu]
rJ2	r(ACUGAGGCCAUGAUUAAGAGGG)-[Flu]

Зонды иммобилизовали, инкубируя раствор соответствующего ОН с частицами сефарозы в 10 мМ гидрокарбонате натрия, рН 8.0 в течение ночи при +4 °С и постоянном перемешивании. Затем проводили щелочной гидролиз непрореагировавших -ОСN 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. На первых этапах использовали смесь только ДНК-мишеней – MJ1 и MJ2, – чтобы исключить риск деградации мишени в водном растворе. Гибридизацию проводили в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего супернатанты переносили, концентрировали и проводили электрофорез в 15% денатурирующем ПААГ (рисунок 3.31).

Использование смеси мишеней позволяет дополнительно подтвердить специфичность гибридизации «зонд-мишень» для каждого из рассматриваемых зондов. Однако специфическое выхватывание мишени наблюдается только в

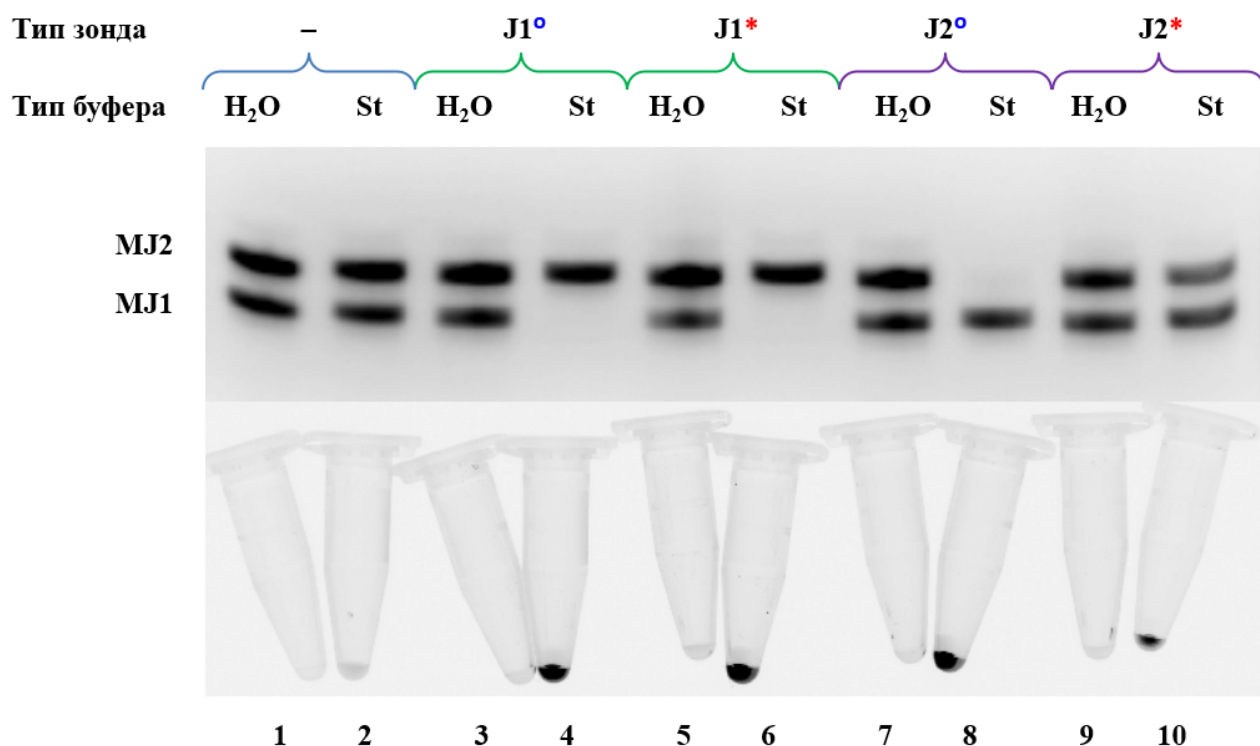


Рисунок 3.31 — Результат электрофоретического анализа смеси ДНК-мишеней MJ1 и MJ2 после инкубации с индивидуальными зондами J1[○], J1^{*}, J2[○], J2^{*}, иммобилизованными на частицах сефарозы, в воде и буферном растворе (St):

- дор. 1-2 – контрольные растворы MJ1 и MJ2 в H₂O и «St»;
- дор. 3-4 – супернатанты после инкубации с J1[○]-сефарозой в H₂O и «St»;
- дор. 5-6 – супернатанты после инкубации с J1^{*}-сефарозой в H₂O и «St»;
- дор. 7-8 – супернатанты после инкубации с J2[○]-сефарозой в H₂O и «St»;
- дор. 9-10 – супернатанты после инкубации с J2^{*}-сефарозой в H₂O и «St»;

Изображение получено в результате сканирования флуоресценции FAM.

Под каждой дорожкой геля изображение пробирки с соответствующей фазой.

присутствии буферного состава (30 мМ Tris-HCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl) вне зависимости от типа иммобилизованного зонда (рисунок 3.31, дор. 4, 6, 8, 10). В деионизованной воде, по всей видимости, комплементарного связывания «зонд-мишень» не происходит, что более чем ожидаемо для нативных – отрицательно заряженных – зондов (рисунок 3.31, дор. 3, 7), но достаточно неожиданно для незаряженных ФГ-зондов (рисунок 3.31, дор. 5, 9), которые, как было показано ранее, не нуждаются в стабилизации комплементарных комплексов катионами. Аналогичные результаты были получены в случае РНК-мишени rJ2: комплементарное связывание с ДНК-зондом происходит только в буферном растворе «St» вне зависимости от наличия ФГ-групп в составе зонда (данные не приведены).

Явная зависимость эффективности выхватывания НК-мишени от наличия катионов в растворе косвенно указывает на наличие каких-либо ионогенных групп в составе исследуемых фаз. Поскольку ФГ-зонды лишены заряженных фосфодиэфирных групп, возникло предположение о наличии отрицательно заряженных остатков в составе самого носителя – сефарозы. 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 BrCN активированной сефарозы, а также частицы агарозы, не подвергавшейся активации бромцианом (и, следовательно, не содержащей -OCN групп), и аналогичного по своей природе носителя – сефадекса. Навески по 5 мг каждого типа фазы инкубировали с растворами красителей (150 мкл 10^{-4} М раствора в 20% этиловом спирте) в течение 2 часов при комнатной температуре, затем регистрировали спектры оптического поглощения раствора над фазой и исходных растворов красителей (рисунок 3.32).

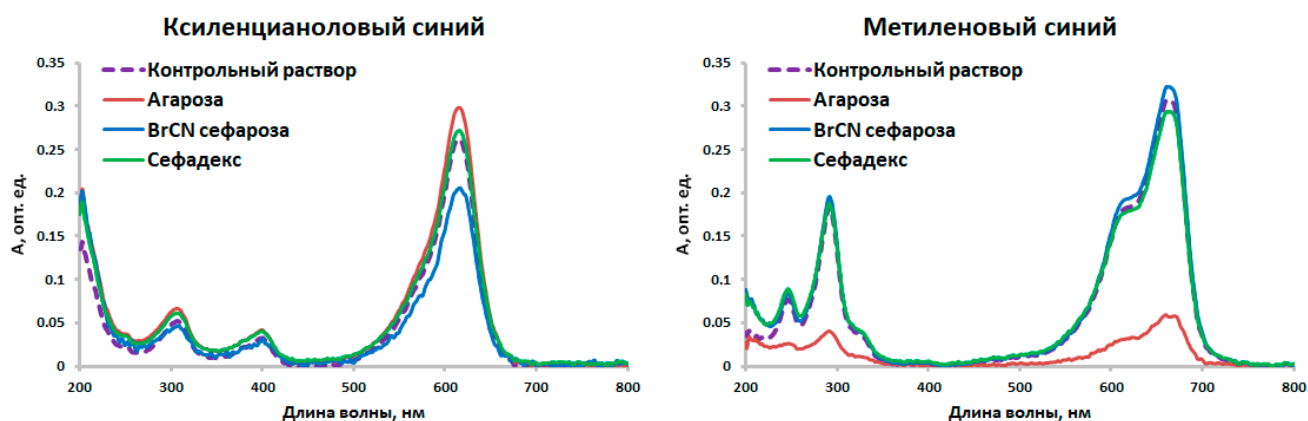


Рисунок 3.32 — Спектры оптического поглощения красителей – ксиленцианолового синего и метиленового синего – до и после инкубации с частицами агарозы, BrCN активированной сефарозы или сефадекса.

Видно, что BrCN сефароза умеренно сорбирует отрицательно заряженный краситель – ксиленцианоловый синий: в сравнении с контрольным раствором интенсивность оптического поглощения на длине волны 616 нм падает на 21.8% (таблица 13). Это может свидетельствовать о наличии положительного заряда на поверхности частиц, а также это может быть связано с непосредственным взаимодействием активных -OCN групп и гидроксигруппы красителя. Положительно заряженный краситель, метиленовый синий, по-видимому, не сорбируется на данный тип частиц: интенсивность оптического поглощения на

длине волны 661 нм после инкубации с фазой даже немного (на 4.5%) увеличилась по сравнению с контрольным раствором, что, возможно, связано с «набуханием» фазы и, как следствие, концентрированием раствора над ней.

Частицы агарозы, напротив, сорбируют именно положительно заряженный краситель: после инкубации с данной фазой раствор красителя визуальнo обесцвечивается, интенсивность поглощения раствора на 661 нм уменьшается на 80.8% по сравнению с контрольным раствором. Интенсивность оптического поглощения ксиленцианолового синего после инкубации с частицами агарозы возрастает на 13.7%, что, вероятно, также связано с концентрированием раствора над фазой.

Последний из рассматриваемых вариантов частиц – «сефадекс», полимер на основе декстрана, – по-видимому, не сорбирует ни один из красителей, поскольку спектры оптического поглощения растворов красителей после инкубации с данной фазой практически не отличаются от спектров контрольных растворов.

Таблица 13 – Значения оптического поглощения на 616 нм для растворов ксиленцианолового синего и 661 нм для растворов метиленового синего.

	Ксиленцианоловый синий		Метиленовый синий	
	A_{616}	ΔA_{616}	A_{661}	ΔA_{616}
Контрольный раствор	0.262		0.308	
BrCN сефароза	0.205	-21.8%	0.322	+4.5%
Агароза	0.298	+13.7%	0.059	-80.8%
Сефадекс	0.272	+3.8%	0.294	-4.5%

Важно отметить, что после щелочного гидролиза -OCN групп BrCN-сефароза интенсивно сорбировала метиленовый синий, аналогично частицам агарозы (данные не приведены). По всей видимости, наличие заряда на поверхности частиц зависит от химической природы материала, из которого они изготовлены, и/или способа формирования частиц – например, вида используемых «сшивающих» реагентов. Действительно, к примеру, сшивающие агенты на основе дикарбоновых кислот могут являться источником свободной карбоксильной группы, которая в водном растворе будет заряжена отрицательно. Возникающий таким образом «потенциал» на поверхности частиц и будет

препятствовать связыванию ФГ-зонда с комплементарной мишенью из-за электростатического отталкивания мишени и самой частицы. 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 выражено липофильным, с другой стороны.

* * *

В данной работе описаны некоторые физико-химические свойства частично или полностью незаряженных ФГО, критичные в контексте их синтеза, очистки и характеристики, а также исследована возможность использования ФГ-производных олигодезоксирибонуклеотидов как праймеров в реакции ОТ.

В первом разделе представлены результаты анализа модельной системы ФГО с разной степенью «незаряженности» методами обращённо-фазовой хроматографии, гель-электрофореза, масс-спектрометрии (ESI MS), УФ-спектрофотометрии, а также термической денатурации комплементарных ДНК-комплексов. Показано, что введение ФГ-групп в состав олигонуклеотида приводит к повышению его гидрофобности и ожидаемому уменьшению заряда, что приводит к снижению электрофоретической подвижности ФГО в стандартном денатурирующем ПААГ и ограничению возможных вариантов молекулярных ионов, детектируемых методом масс-спектрометрии. Предложен авторский подход к электрофоретическому анализу заведомо электронейтральных ФГО в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Методом термической денатурации ДНК-комплексов продемонстрирована способность незаряженных ФГО к связыванию комплементарной ДНК вне зависимости от наличия катионов в растворе.

Во втором разделе обсуждается особенность синтеза функциональных ОН на основе ФГО, связанная с чувствительностью ФГ-звена к действию нуклеофильных агентов. На примере синтеза ФГО, содержащего 3'-концевую ненуклеотидную вставку, несущую остаток биотина, обнаружено явление деструкции синтезируемого ОН на этапе деблокирования в концентрированном водном аммиаке. Установлено, что причиной деструкции является непосредственная близость ФГ-группы и гидроксигруппы линкера в составе ненуклеотидного звена. Предложен возможный механизм деструкции, основанный на анхимерном содействии прилегающей гидроксигруппы. Обнаруженный феномен может ограничивать множество функциональных конструкций, содержащих ФГ-звенья.

В третьем разделе представлены эксперименты по ферментативному удлинению частично или полностью незаряженных ФГО обратной транскриптазой вируса лейкемии мышей MMLV. Впервые в данной работе продемонстрирована способность незаряженных ФГО выступать праймером-затравкой для

РНК-зависимой ДНК-полимеризы. На примере протяженной РНК-матрицы (фрагмент 18S рРНК человека) и набора флуоресцентно-меченых ФГО проведено сравнение эффективности удлинения ФГО в буферных растворах со стандартной и пониженной ионной силой. Показано, что снижение ионной силы может приводить к повышенному накоплению протяжённых продуктов элонгации. Также на примере гомополимерных rA/dT субстратов рассмотрено явление «проскальзывания». Наличие ФГ-групп, по-видимому, уменьшает вероятность нуклеотидных перестроек такого типа за счёт стабилизации НК-субстрата.

В четвёртом, заключительном разделе приведены результаты экспериментов по ковалентной иммобилизации ФГО на поверхности частиц различной природы: полистирольного носителя для олигонуклеотидного синтеза и BrCN-активированной сефарозы. Обнаружена проблема неспецифической сорбции НК на поверхность полистирольных частиц, обусловленная, вероятно, гидрофобным взаимодействием НК с поверхностью. Предложен способ иммобилизации ФГО на поверхность BrCN-сефарозы и проведено сравнение выхватывания ДНК-мишеней из растворов с различной ионной силой. Показано, что эффективное выхватывание наблюдается только в солесодержащих растворах вне зависимости от типа иммобилизованного зонда, что связано, по-видимому, с наличием отрицательного заряда на поверхности частиц сефарозы как таковых.

Заключение

Данная работа описывает ключевые характеристики ФГО, принципиальные для разработки на их основе функциональных олигонуклеотидных зондов, праймеров, адаптеров. Введение в структуру ON нескольких остатков DMI, нивелирующих отрицательный заряд выбранных фосфодиэфирных остатков, приводит к возникновению особенностей характеристики данных производных, а именно:

- увеличению времени удерживания ФГО на обращённой фазе, свидетельствующему о повышенной гидрофобности ФГО в сравнении с нативным аналогом;
- уменьшению электрофоретической подвижности ФГО в условиях «стандартного» денатурирующего ПААГ;
- увеличению оптического поглощения ФГО в диапазоне длин волн 200-240 нм;
- ограничению множества молекулярных ионов, обнаруживаемых методом масс-спектрометрии с электроспрей ионизацией в режиме детекции полианионов.

Для заведомо незаряженных ФГО предложен новый подход к электрофоретическому анализу в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Показано, что в электрофоретической системе, содержащей 0.05% SDS и 5 М мочевины, ФГ-олиготимидилаты мигрируют в геле, причём скорость миграции практически не зависит от длины олигонуклеотидной цепочки, но зависит от числа остатков DMI в структуре, то есть отражает зарядовое состояние синтезированных ФГО.

На примере ФГО с различным числом остатков DMI исследована термическая стабильность ДНК-комплексов в растворах с различной ионной силой. Показано, что в случае высокой ионной силы среды введение DMI в структуру комплекса приводит к умеренной его дестабилизации (около $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{DMI}$) за счёт, вероятно, нарушения сольватации комплекса. В случае низкой ионной силы раствора (менее 10 мМ), напротив, ФГО образуют более стабильные ДНК-комплексы, чем нативный ON: введение одного остатка DMI увеличивает температуру плавления дуплекса на 1-2 $^{\circ}\text{C}$. В случае электронейтрального ФГО термостабильность комплементарного комплекса практически не зави-

сит от ионной силы среды, что позволяет использовать ФГО как зонды для выхватывания комплементарных НК в низкосолевых средах, в том числе в деионизованной воде.

Также в данной работе обнаружена проблема деградации ФГ-звена в процессе синтеза функционального производного ФГО, содержащего ненуклеотидную вставку, несущую остаток биотина. При помощи методов масс-спектрометрии и SDS гель-электрофореза установлено, что причиной деградации является близость ФГ-звена и прилегающей гидроксигруппы линкера в составе ненуклеотидной вставки. Предложен возможный механизм деградации, подразумевающий реализацию анхимерного содействия гидроксигруппы и последующий гидролиз «циклического» фосфорилгуанидина в присутствии оснований. Данный феномен – чувствительность ФГ-звена к действию нуклеофильных агентов – ограничивает спектр доступных функциональных производных на основе ФГО.

Из литературных данных о других незаряженных производных НК – морфолиновых олигонуклеотидах и пептидо-нуклеиновых кислотах – известно, что они не могут участвовать в ферментативных превращениях. В данной работе проведено исследование субстратных свойств ФГО в отношении реакции обратной транскрипции, а именно:

- на модельных ДНК/РНК-субстратах, содержащих различное число ДМІ, впервые продемонстрировано ферментативное удлинение ФГ-праймера, включая полностью электронейтральный;
- на примере высокоструктурированной РНК-матрицы – фрагмента 18S рРНК – проведена элонгация ФГ-праймеров в растворах с различной ионной силой. Показано, что снижение ионной силы может способствовать накоплению более протяжённых продуктов элонгации;
- на примере гомополимерных гА/dТ-субстратов изучен феномен перестройки НК-субстрата: так называемое «проскальзывание» праймера вдоль матричной цепи с образованием продуктов элонгации, длина которых превышает длину РНК-матрицы;
- показано, что ФГ-олиготимидилаты гораздо менее эффективно удлиняются по матрице гА₆₀, что может свидетельствовать о подавлении синтеза через «проскальзывание» за счёт стабилизации НК-субстрата.

Также была исследована возможность ковалентной иммобилизации ФГО на поверхность с целью сконструировать систему для селективного «вы-

хватывания» ДНК-мишени из раствора. В качестве носителя рассмотрены полистирольные частицы и BrCN-активированная сефароза. Показано, что:

- полистирольные частицы неспецифически сорбируют НК из водных растворов;
- ковалентная иммобилизация ФГО, содержащих аминогруппу, на поверхность BrCN-активированной сефарозы достигается в результате инкубации частиц и ФГО в 10 мМ гидрокарбонате натрия, рН 8.0, в течение ночи при +4 °С;
- специфическое хватывание ДНК-мишени на частицы сефарозы происходит только при наличии солей в растворе вне зависимости от типа иммобилизованного зонда;
- в деионизованной воде частицы сефарозы (в т.ч. не содержащие зонда) могут обладать отрицательным зарядом, препятствующим, по всей видимости, гибридизации зонда с НК-мишенью.

Способность незаряженных ФГО образовывать комплементарные комплексы в растворах с ультранизкой ионной силой, многообразие и доступность функциональных конструкций на основе ФГО в сочетании с возможностью их удлинения РНК-зависимой ДНК-полимеразой делают ФГО уникальным материалом, значительно отличающимся от других известных незаряженных производных НК. Таким образом, на основе полученных данных можно заключить, что ФГО являются перспективной платформой для создания эффективного олигонуклеотидного инструментария, необходимого для развития методов очистки и анализа целевых НК-мишеней.

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: протяжённые 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. Продемонстрирована возможность ковалентной иммобилизации электронейтральных ФГО на поверхности частиц BrCN-активированной сефарозы.

Показана критическая значимость химической природы используемого полимерного носителя: наличие анионогенных групп в составе частиц препятствует взаимодействию ФГО-зонда с комплементарной НК-мишенью в отсутствие катионов в растворе.

Список сокращений и условных обозначений

AMV	avian myeloblastosis virus, вирус птичьей миелобластомы
Boc	трет-бутилоксикарбонильная защитная группа
CaсNa	какодилат натрия $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$
CPG	controlled pore glass, стекло с контролируемым размером пор
DIPEA	диизопропилэтиламин
DMI	1,3-dimethylimidazolidine-2-imine, N,N-диметилимидазолидин-2-имин
DMTr	диметокситритильная защитная группа
EDTA, ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ESI MS	electrospray ionization mass spectrometry, масс-спектрометрия с электроспреей ионизацией
FAM	остаток флуоресцеина
Fmoc	флуоренилметилоксикарбонильная защитная группа
HIV-1	human immunodeficiency virus 1, вирус иммунодефицита человека
LTR	long terminal repeat, длинный терминальный повтор
MMLV	Moloney murine leukemia virus, вирус лейкемии мышей Молони
MMTr	монометокситритильная защитная группа
ON	oligonucleotide, олигонуклеотид
PBS	primer binding site, сайт связывания праймера
PPT	polypurine tract, полипуриновый тракт
SDS	sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия
TEA	триэтиламин
Tr	тритильная защитная группа
Tris	трис(гидроксиметил)аминометан
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
МО	морфолиновые олигонуклеотиды
НК	нуклеиновая кислота
ОТ	обратная транскрипция
ОФ-ВЭЖХ	обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФХ	обращённо-фазовая хроматография
ПААГ	полиакриламидный гель
ПНК	пептидо-нуклеиновая кислота
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
ТГФ	тетрагидрофуран
ТСХ	тонкослойная хроматография
ФГ	фосфорилгуанидиновый
ФГО	фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды
ЯМР	спектроскопия ядерного магнитного резонанса
е.а.	единицы активности
кДНК	комплементарная ДНК
рРНК	рибосомальная РНК
тРНК	транспортная РНК

Словарь терминов

Плавление НК-дуплекса – процесс термической денатурации комплементарного комплекса НК с образованием одноцепочечных ДНК (РНК) в растворе. «Температура плавления» комплекса соответствует денатурации 50% молекул дуплекса.

Гибридизация НК – нековалентное связывание одноцепочечных НК согласно принципу комплементарности.

Отжиг праймера – гибридизация олигонуклеотида на комплементарный участок НК-мишени.

Выхватывание НК-мишени – удаление НК из раствора за счёт формирования комплементарного комплекса с олигонуклеотидным зондом, иммобилизованным на поверхности.

Список литературы

1. *Eckstein F.* Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides // *Nucleic Acid Ther.* — 2014. — Vol. 24. — P. 374—387.
2. *Rettig G. R., Behlke M. A.* Progress toward in vivo use of siRNAs-II // *Molecular therapy.* — 2012. — Vol. 20. — P. 483—512.
3. *Braasch D. A., Corey D. R.* Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA // *Chemistry & biology.* — 2001. — Vol. 8. — P. 1—7.
4. *Nielsen P. E.* Peptide nucleic acids (PNA) in chemical biology and drug discovery // *Chemistry & biodiversity.* — 2010. — Vol. 7. — P. 786—804.
5. *Du L., Gatti R. A.* Potential therapeutic applications of antisense morpholino oligonucleotides in modulation of splicing in primary immunodeficiency diseases // *Journal of immunological methods.* — 2011. — Vol. 365. — P. 1—7.
6. *Pyshnaya I., Lomzov A., Pyshnyi D.* Bridged Oligonucleotides with Smoothed Hybridization Properties as a Tool for Analysis of Nucleotide Sequences // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* — 2019. — Vol. 45. — P. 677—683.
7. *Meschaninova M. I., Entelis N. S., Chernolovskaya E. L., Venyaminova A. G.* A Versatile Solid-Phase Approach to the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates with Biodegradable Hydrazone Linker // *Molecules.* — 2021. — Vol. 26, no. 8.
8. *Kor K., Turner A. P., Zarei K., Atabati M., Beni V., Mak W. C.* Structurally responsive oligonucleotide-based single-probe lateral-flow test for detection of miRNA-21 mimics // *Analytical and bioanalytical chemistry.* — 2016. — Vol. 408. — P. 1475—1485.
9. *Kupryushkin M., Pyshnyi D., Stetsenko D.* Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues // *Acta Naturae.* — 2014. — Vol. 6. — P. 116—118.
10. *Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D.* — WO2016028187A1. Priority from 22.06.2014.

11. *Verma S., Eckstein F.* Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users // Annual review of biochemistry. — 1998. — Vol. 67. — P. 99—134.
12. *Meteliev V., Oretskaya T.* Modified oligonucleotides: new structures, new properties, and new spheres of application // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2021. — Vol. 47. — P. 339—343.
13. *Glazier D. A., Liao J., Roberts B. L., Li X., Yang K., Stevens C. M., Tang W.* Chemical synthesis and biological application of modified oligonucleotides // Bioconjugate Chemistry. — 2020. — Vol. 31. — P. 1213—1233.
14. *Bennett C. F.* Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age // Annual review of medicine. — 2019. — Vol. 70. — P. 307—321.
15. *Michelson A., Todd A. R.* Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3':5'-internucleotidic linkage // Journal of the Chemical Society. — 1955. — P. 2632—2638.
16. *Hall R., Todd A., Webb R.* 644. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates // Journal of the Chemical Society (Resumed). — 1957. — P. 3291—3296.
17. *Khorana H., Tener G., Moffatt J., Pol E.* Chem. Ind. London. — 1956.
18. *Letsinger R. L., Mahadevan V.* Oligonucleotide synthesis on a polymer support // Journal of the American Chemical Society. — 1965. — Vol. 87. — P. 3526—3527.
19. *Letsinger R. L., Ogilvie K. K.* Convenient method for stepwise synthesis of oligothymidylate derivatives in large-scale quantities // Journal of the American Chemical Society. — 1967. — Vol. 89. — P. 4801—4803.
20. *Letsinger R. L., Lunsford W. B.* Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates // Journal of the American Chemical Society. — 1976. — Vol. 98. — P. 3655—3661.
21. *Beaucage S., Caruthers M.* Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis // Tetrahedron letters. — 1981. — Vol. 22. — P. 1859—1862.
22. *Benizri S., Gissot A., Martin A., Vialet B., Grinstaff M. W., Barthélémy P.* Bioconjugated oligonucleotides: recent developments and therapeutic applications // Bioconjugate chemistry. — 2019. — Vol. 30. — P. 366—383.

23. *Anosova I., Kowal E. A., Dunn M. R., Chaput J. C., Van Horn W. D., Egli M.* The structural diversity of artificial genetic polymers // *Nucleic acids research.* — 2015. — Vol. 44. — P. 1007—1021.
24. *Lebedeva N. A., Anarbaev R. O., Kupryushkin M. S., Rechkunova N. I., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A., Lavrik O. I.* Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic/apyrimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // *Bioconjugate chemistry.* — 2015. — Vol. 26. — P. 2046—2053.
25. *Epanchintseva A., Dolodoev A., Grigor'eva A., Chelobanov B., Pyshnyi D., Ryabchikova E., Pyshnaya I.* Non-covalent binding of nucleic acids with gold nanoparticles provides their stability and effective desorption in environment mimicking biological media // *Nanotechnology.* — 2018. — Vol. 29. — P. 355601.
26. *Benner S. A.* Detecting Darwinism from molecules in the Enceladus plumes, Jupiter's moons, and other planetary water lagoons // *Astrobiology.* — 2017. — Vol. 17. — P. 840—851.
27. *Egholm M., Buchardt O., Nielsen P. E., Berg R. H.* Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone // *Journal of the American Chemical Society.* — 1992. — Vol. 114. — P. 1895—1897.
28. *Summerton J. E.* Invention and early history of morpholinos: from pipe dream to practical products // *Morpholino Oligomers.* — 2017. — P. 1—15.
29. *Miller P. S., Yano J., Yano E., Carroll C., Jayaraman K., Ts'o P. O.* Nonionic nucleic acid analogs. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates // *Biochemistry.* — 1979. — Vol. 18. — P. 5134—5143.
30. *Fettes K. J., Howard N., Hickman D. T., Adah S. A., Player M. R., Torrence P. F., Micklefield J.* Replacement of the phosphodiester linkage in DNA with sulfamide and 3'-N-sulfamate groups // *Chemical Communications.* — 2000. — P. 765—766.
31. *De Mesmaeker A., Altmann K.-H., Waldner A., Wendeborn S.* Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems // *Current opinion in structural biology.* — 1995. — Vol. 5. — P. 343—355.

32. *Jain M. L., Bruice P. Y., Szabo I. E., Bruice T. C.* Incorporation of positively charged linkages into DNA and RNA backbones: a novel strategy for antigene and antisense agents // *Chemical Reviews*. — 2012. — Vol. 112. — P. 1284—1309.
33. *Bhadra J., Pattanayak S., Sinha S.* Synthesis of morpholino monomers, chlorophosphoramidate monomers, and solid-phase synthesis of short morpholino oligomers // *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. — 2015. — Vol. 62. — P. 4—65.
34. *Paul S., Caruthers M. H.* Synthesis of phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides and their chimeras using phosphoramidite chemistry // *Journal of the American Chemical Society*. — 2016. — Vol. 138. — P. 15663—15672.
35. *Summerton J. E.* Morpholinos and PNAs compared // *Peptide nucleic acids, morpholinos and related antisense biomolecules*. — Springer, 2006. — P. 89—113.
36. *Mayfield L. D., Corey D. R.* Automated synthesis of peptide nucleic acids and peptide nucleic acid-peptide conjugates // *Analytical biochemistry*. — 1999. — Vol. 268. — P. 401—404.
37. *Braasch D. A., Nulf C. J., Corey D. R.* Synthesis and purification of peptide nucleic acids // *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. — 2002. — Vol. 9. — P. 4—11.
38. *Musumeci D., Roviello G. N., Valente M., Sapio R., Pedone C., Bucci E. M.* New synthesis of PNA-3' DNA linker monomers, useful building blocks to obtain PNA/DNA chimeras // *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*. — 2004. — Vol. 76. — P. 535—542.
39. *Moggio L., Romanelli A., Gambari R., Bianchi N., Borgatti M., Fabbri E., Mancini I., Blasio B. di, Pedone C., Messere A.* Alternate PNA-DNA chimeras (PNA-DNA)_n: Synthesis, binding properties and biological activity // *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*. — 2007. — Vol. 88. — P. 815—822.
40. *Koppitz M., Nielsen P. E., Orgel L. E.* Formation of oligonucleotide- PNA-chimeras by template-directed ligation // *Journal of the American Chemical Society*. — 1998. — Vol. 120. — P. 4563—4569.

41. *Muangkaew P., Vilaivan T.* Modulation of DNA and RNA by PNA // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 2020. — Vol. 30. — P. 127064.
42. *Al Hussein L., Maleki A., Al Marjani M.* Antisense mqsR-PNA as a putative target to the eradication of *Pseudomonas aeruginosa* persisters // *New Microbes and New Infections*. — 2021. — Vol. 41. — P. 100868.
43. *Löschner T., Engels J. W.* Methylphosphonamidites: preparation and application in oligodeoxynucleoside methyl-phosphonate synthesis // *Nucleosides & nucleotides*. — 1988. — Vol. 7. — P. 729—732.
44. *Miller P. S.* Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents // *Bio/Technology*. — 1991. — Vol. 9. — P. 358—362.
45. *Nagahama K., Veedu R. N., Wengel J.* Nuclease resistant methylphosphonate-DNA/LNA chimeric oligonucleotides // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. — 2009. — Vol. 19. — P. 2707—2709.
46. *Reynolds M. A., Hogrefe R. I., Jaeger J. A., Schwartz D. A., Riley T. A., Marvin W. B., Daily W. J., Vaghefi M. M., Beck T. A., Knowles S. K., [et al.].* Synthesis and thermodynamics of oligonucleotides containing chirally pure R P methylphosphonate linkages // *Nucleic acids research*. — 1996. — Vol. 24. — P. 4584—4591.
47. *Vyazovkina E. V., Savchenko E. V., Lokhov S. G., Engels J. W., Wickstrom E., Lebedev A. V.* Synthesis of specific diastereomers of a DNA methylphosphonate heptamer, d (CpCpApApApCpA), and stability of base pairing with the normal DNA octamer d (TpGpTpTpTpGpGpC) // *Nucleic acids research*. — 1994. — Vol. 22. — P. 2404—2409.
48. *Agarwal K. L., Riftina F.* Synthesis and enzymatic properties of deoxyribooligonucleotides containing methyl and phenylphosphonate linkages // *Nucleic Acids Research*. — 1979. — Vol. 6. — P. 3009—3024.
49. *Miller P. S., Annan N. D., McParland K. B., Pulford S. M.* Oligothymidylate analogs having stereoregular, alternating methylphosphonate/phosphodiester backbones as primers for DNA polymerase // *Biochemistry*. — 1982. — Vol. 21. — P. 2507—2512.

50. *Miller P. S., Chandrasegaran S., Dow D. L., Pulford S. M., Kan L. S.* Synthesis and template properties of an ethyl phosphotriester modified decadeoxyribonucleotide // *Biochemistry*. — 1982. — Vol. 21. — P. 5468—5474.
51. *Lomzov A. A., Kupryushkin M. S., Shernyukov A. V., Nekrasov M. D., Dovydenko I. S., Stetsenko D. A., Pyshnyi D. V.* Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: Isolation and properties // *Biochemical and biophysical research communications*. — 2019. — Vol. 513. — P. 807—811.
52. *Ivanov V., Minchenkova L., Schyolkina A., Poletayev A.* Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. — 1973. — Vol. 12. — P. 89—110.
53. *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.
54. *Golyshev V. M., Pyshnyi D. V., Lomzov A. A.* Effects of phosphoryl guanidine modification of phosphate residues on the structure and hybridization of oligodeoxyribonucleotides // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2021. — Vol. 125. — P. 2841—2855.
55. *Kuznetsov N. A., Kupryushkin M. S., Abramova T. V., Kuznetsova A. A., Miroshnikova A. D., Stetsenko D. A., Pyshnyi D. V., Fedorova O. S.* New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 // *Molecular BioSystems*. — 2016. — Vol. 12. — P. 67—75.
56. *Pavlova A. S., Dovydenko I. S., Kupryushkin M. S., Grigor'eva A. E., Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V.* Amphiphilic "like-a-brush" oligonucleotide conjugates with three dodecyl chains: self-assembly features of novel scaffold compounds for nucleic acids delivery // *Nanomaterials*. — 2020. — Vol. 10. — P. 1948.

57. *Garafutdinov R. R., Sakhabutdinova A. R., Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V.* Prevention of DNA multimerization using phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo-DNA polymerase // *Biochimie.* — 2020. — Vol. 168. — P. 259—267.
58. *Chubarov A. S., Oscorbin I. P., Filipenko M. L., Lomzov A. A., Pyshnyi D. V.* Allele-specific PCR for KRAS mutation detection using phosphoryl guanidine modified primers // *Diagnostics.* — 2020. — Vol. 10. — P. 872.
59. *Levin J. Z., Yassour M., Adiconis X., Nusbaum C., Thompson D. A., Friedman N., Gnirke A., Regev A.* Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods // *Nature methods.* — 2010. — Vol. 7. — P. 709—715.
60. *Ansorge W. J.* Next-generation DNA sequencing techniques // *New biotechnology.* — 2009. — Vol. 25. — P. 195—203.
61. *Schmidt W. M., Mueller M. W.* CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs // *Nucleic acids research.* — 1999. — Vol. 27. — e31—i.
62. *Shi X., Karkut T., Chahmanhkah M., Alting-Mees M., Hemmingsen S., Hegedus D.* 5'-RACEing across a bridging oligonucleotide // *BioTechniques.* — 2002. — Vol. 32. — P. 480—482.
63. *Chen D., Patton J. T.* Reverse transcriptase adds nontemplated nucleotides to cDNAs during 5'-RACE and primer extension // *Biotechniques.* — 2001. — Vol. 30. — P. 574—582.
64. *Bogdanova E. A., Shagina I., Barsova E. V., Kelmanson I., Shagin D. A., Lukyanov S. A.* Normalizing cDNA libraries // *Current protocols in molecular biology.* — 2010. — Vol. 90. — P. 5—12.
65. *Morlan J. D., Qu K., Sinicropi D. V.* Selective depletion of rRNA enables whole transcriptome profiling of archival fixed tissue // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7. — e42882.
66. *Uhlmann E.* Peptide nucleic acids (PNA) and PNA-DNA chimeras: from high binding affinity towards biological function. // *Biological chemistry.* — 1998. — Vol. 379. — P. 1045—1052.

67. *Ura H., Togi S., Niida Y.* Poly (A) capture full length cDNA sequencing improves the accuracy and detection ability of transcript quantification and alternative splicing events // *Scientific reports*. — 2022. — Vol. 12. — P. 1—10.
68. *O’Neil D., Glowatz H., Schlumpberger M.* Ribosomal RNA depletion for efficient use of RNA-seq capacity // *Current protocols in molecular biology*. — 2013. — Vol. 103. — P. 4—19.
69. *Petrova O. E., Garcia-Alcalde F., Zampaloni C., Sauer K.* Comparative evaluation of rRNA depletion procedures for the improved analysis of bacterial biofilm and mixed pathogen culture transcriptomes // *Scientific reports*. — 2017. — Vol. 7. — P. 1—15.
70. *Peano C., Pietrelli A., Consolandi C., Rossi E., Petiti L., Tagliabue L., De Bellis G., Landini P.* An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria // *Microbial informatics and experimentation*. — 2013. — Vol. 3. — P. 1—11.
71. *Wahl A., Huptas C., Neuhaus K.* Comparison of rRNA depletion methods for efficient bacterial mRNA sequencing // *Scientific reports*. — 2022. — Vol. 12. — P. 1—11.
72. *Cui P., Lin Q., Ding F., Xin C., Gong W., Zhang L., Geng J., Zhang B., Yu X., Yang J., [et al.].* A comparison between ribo-minus RNA-sequencing and polyA-selected RNA-sequencing // *Genomics*. — 2010. — Vol. 96. — P. 259—265.
73. *Schwarz F. P., Robinson S., Butler J. M.* Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature // *Nucleic acids research*. — 1999. — Vol. 27. — P. 4792—4800.
74. *Hu W., Ning Y., Li L., Kong J., Zhang X.* Highly sensitive detection of sequence-specific DNA with morpholino-functionalized magnetic microspheres // *Analytical Methods*. — 2015. — Vol. 7. — P. 6712—6717.
75. *Wages Jr J., Wages G., Matthews P., Weller D., Summerton J.* Affinity purification of RNA: sequence-specific capture by nonionic morpholino probes // *Biotechniques*. — 1997. — Vol. 23. — P. 1116—1121.
76. *Gerard G. F., Fox D. K., Nathan M., D’alessio J. M.* Reverse transcriptase // *Molecular biotechnology*. — 1997. — Vol. 8. — P. 61—77.

77. *Boyer J. C., Bebenek K., Kunkel T. A.* Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* — 1992. — Vol. 89. — P. 6919—6923.
78. *Whiting S. H., Champoux J. J.* Properties of strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mechanistic implications // *Journal of molecular biology.* — 1998. — Vol. 278. — P. 559—577.
79. *Huber H. E., McCoy J. M., Seehra J. S., Richardson C. C.* Human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase: Template binding, processivity, strand displacement synthesis, and template switching. // *Journal of Biological Chemistry.* — 1989. — Vol. 264. — P. 4669—4678.
80. *Coutsinos D., Invernizzi C. F., Moisi D., Oliveira M., Martinez-Cajas J. L., Brenner B. G., Wainberg M. A.* A template-dependent dislocation mechanism potentiates K65R reverse transcriptase mutation development in subtype C variants of HIV-1 // *PloS one.* — 2011. — Vol. 6. — e20208.
81. *Bebenek K., Abbotts J., Wilson S., Kunkel T.* Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots // *Journal of Biological Chemistry.* — 1993. — Vol. 268. — P. 10324—10334.
82. *Furfine E. t., Reardon J.* Reverse transcriptase. RNase H from the human immunodeficiency virus. Relationship of the DNA polymerase and RNA hydrolysis activities. // *Journal of Biological Chemistry.* — 1991. — Vol. 266. — P. 406—412.
83. *Schultz S. J., Champoux J. J.* RNase H domain of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase retains activity but requires the polymerase domain for specificity // *Journal of virology.* — 1996. — Vol. 70. — P. 8630—8638.
84. *Hallinan F., Lee S., Rozee K.* Demonstration of primer stimulated DNA synthesis by soluble reverse transcriptase // *Archives of Virology.* — 1981. — Vol. 70. — P. 285—289.
85. *Oz-Gleenberg I., Herzig E., Hizi A.* Template-independent DNA synthesis activity associated with the reverse transcriptase of the long terminal repeat retrotransposon Tf1 // *The FEBS Journal.* — 2012. — Vol. 279. — P. 142—153.

86. *Zajac P., Islam S., Hochgerner H., Lönnerberg P., Linnarsson S.* Base preferences in non-templated nucleotide incorporation by MMLV-derived reverse transcriptases // *PloS one.* — 2013. — Vol. 8. — e85270.
87. *Gerard G. F., Potter R. J., Smith M. D., Rosenthal K., Dhariwal G., Lee J., Chatterjee D. K.* The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation // *Nucleic acids research.* — 2002. — Vol. 30. — P. 3118—3129.
88. *Yasukawa K., Mizuno M., Konishi A., Inouye K.* Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis // *Journal of biotechnology.* — 2010. — Vol. 150. — P. 299—306.
89. *Fratczak A., Kierzek R., Kierzek E.* LNA-modified primers drastically improve hybridization to target RNA and reverse transcription // *Biochemistry.* — 2009. — Vol. 48. — P. 514—516.
90. *Petersen M., Wengel J.* LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics // *Trends in biotechnology.* — 2003. — Vol. 21. — P. 74—81.
91. *Crouzier L., Dubois C., Edwards S. L., Lauridsen L. H., Wengel J., Veedu R. N.* Efficient reverse transcription using locked nucleic acid nucleotides towards the evolution of nuclease resistant RNA aptamers // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7. — e35990.
92. *Noir R., Kotera M., Pons B., Remy J.-S., Behr J.-P.* Oligonucleotide-oligospermine conjugates (zip nucleic acids): a convenient means of finely tuning hybridization temperatures // *Journal of the American Chemical Society.* — 2008. — Vol. 130. — P. 13500—13505.
93. *Moreau V., Voirin E., Paris C., Kotera M., Nothisen M., Remy J.-S., Behr J.-P., Erbacher P., Lenne-Samuel N.* Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription // *Nucleic acids research.* — 2009. — Vol. 37. — e130—e130.
94. *Van Heuverswyn F., Karczmarczyk M., Schimmel H., Trapmann S., Emons H.* Influence of primer & probe chemistry and amplification target on reverse transcription digital PCR quantification of viral RNA // *Biomolecular detection and quantification.* — 2016. — Vol. 9. — P. 20—28.

95. *Iijima Y., Kojima S., Kodama E., Kurohagi S., Kanamori T., Masaki Y., Ohkubo A., Sekine M., Seio K.* Modified oligodeoxynucleotide primers for reverse-transcription of target RNAs that can discriminate among length variants at the 3'-terminus // *Organic & Biomolecular Chemistry*. — 2013. — Vol. 11. — P. 8276—8282.
96. *Golubeva A., Ermolinsky B., Efimtseva E., Tunitskaya V., Van Aerschot A., Herdewijn P., Mikhailov S., Kochetkov S.* Interaction of HIV-1 Reverse Transcriptase with Modified Oligonucleotide Primers Containing 2'-O- β -D-Ribofuranosyladenosine // *Biochemistry (Moscow)*. — 2004. — Vol. 69. — P. 130—136.
97. *Andreeva O., Golubeva A., Kochetkov S., Van Aerschot A., Herdewijn P., Efimtseva E., Ermolinsky B., Mikhailov S.* An additional 2'-ribofuranose residue at a specific position of the DNA primer prevents Its elongation by HIV-1 reverse transcriptase // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. — 2002. — Vol. 12. — P. 681—684.
98. *Jacobo-Molina A., Ding J., Nanni R. G., Clark Jr A. D., Lu X., Tantillo C., Williams R. L., Kamer G., Ferris A. L., Clark P.* Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1993. — Vol. 90. — P. 6320—6324.
99. *Ohtsubo Y., Sasaki H., Nagata Y., Tsuda M.* Optimization of single strand DNA incorporation reaction by Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase // *DNA Research*. — 2018. — Vol. 25. — P. 477—487.
100. *Wulf M. G., Maguire S., Humbert P., Dai N., Bei Y., Nichols N. M., Corrêa I. R., Guan S.* Non-templated addition and template switching by Moloney murine leukemia virus (MMLV)-based reverse transcriptases co-occur and compete with each other // *Journal of Biological Chemistry*. — 2019. — Vol. 294. — P. 18220—18231.
101. *Kapteyn J., He R., McDowell E. T., Gang D. R.* Incorporation of non-natural nucleotides into template-switching oligonucleotides reduces background and improves cDNA synthesis from very small RNA samples // *BMC genomics*. — 2010. — Vol. 11. — P. 1—9.

102. *Cavaluzzi M. J., Borer P. N.* Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA // *Nucleic acids research.* — 2004. — Vol. 32. — e13—e13.
103. *Lomzov A. A., Gorelov V. V., Golyshev V. M., Abramova T. V., Pyshnyi D. V.* Analysis of structure and thermodynamics of modified DNA duplexes using molecular dynamics simulation // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* — 2015. — Vol. 33. — P. 90—91.
104. *Bailey J. K., Shen W., Liang X.-h., Crooke S. T.* Nucleic acid binding proteins affect the subcellular distribution of phosphorothioate antisense oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — Vol. 45. — P. 10649—10671.
105. *Ed. Magdelin S.* Gel Electrophoresis – Principles and Basics. — Rijeka, Croatia : InTech, 2012.
106. *Reynolds J. A., Tanford C.* Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* — 1970. — Vol. 66. — P. 1002—1007.
107. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
108. *Kumar S., Parveen N., Kabir-ud-Din.* Effect of urea addition on micellization and the related phenomena // *The Journal of Physical Chemistry B.* — 2004. — Vol. 108. — P. 9588—9592.
109. *Bazhenov M., Shernyukov A., Kupryushkin M., Pyshnyi D.* Study of the Staudinger reaction and reveal of key factors affecting the efficacy of automatic synthesis of phosphoryl guanidinic oligonucleotide analogs // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* — 2019. — Vol. 45. — P. 699—708.
110. *Fokina A., Wang M., Ilyina A., Klabenkova K., Burakova E., Chelobanov B., Stetsenko D.* Analysis of new charge-neutral DNA/RNA analogues phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO) by gel electrophoresis // *Analytical biochemistry.* — 2018. — Vol. 555. — P. 9—11.

111. *Lin W. O., Guimarātes C. N., De Souza M. C., Da Costa J. B., Alt H. G.* Synthesis and preliminary complexation studies of dialkylphosphorylthiourea and guanidines // Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. — 1994. — Vol. 92. — P. 1—9.
112. *Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V., Lomzov A. A., Zarytova V. F., Ivanova E. M.* The Influence of the Non-Nucleotide Insert on the Hybridization Properties of Oligonucleotides // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. — 2004. — Vol. 23. — P. 1065—1071.
113. *Komiyama M., Ye S., Liang X., Yamamoto Y., Tomita T., Zhou J.-M., Aburatani H.* PNA for one-base differentiating protection of DNA from nuclease and its use for SNPs detection // Journal of the American Chemical Society. — 2003. — Vol. 125. — P. 3758—3762.
114. *Lokhov S., Pyshnyi D.* Thermodynamic and spectral properties of DNA miniduplexes with the terminal G·A mispairs and 3' or 5' dangling bases // FEBS letters. — 1997. — Vol. 420. — P. 134—138.
115. *Kraus A. J., Brink B. G., Siegel T. N.* Efficient and specific oligo-based depletion of rRNA // Scientific reports. — 2019. — Vol. 9. — P. 1—8.
116. *Борисова В., Пышная И., Пышный Д., Франк Л.* Высокочувствительный и быстрый метод выявления ДНК-фрагментов с использованием фотопротейна обелина как репортера // Биоорганическая химия. — 2008. — Т. 34. — С. 792—798.
117. *Maiti M., Michielssens S., Dyubankova N., Maiti M., Lescrinier E., Ceulemans A., Herdewijn P.* Influence of the nucleobase and anchimeric assistance of the carboxyl acid groups in the hydrolysis of amino acid nucleoside phosphoramidates // Chemistry—A European Journal. — 2012. — Vol. 18. — P. 857—868.
118. *Kupryushkin M. S., Konevets D. A., Vasilyeva S. V., Kuznetsova A. S., Stetsenko D. A., Pyshnyi D. V.* Oligonucleotide functionalization by a novel alkyne-modified nonnucleosidic reagent obtained by versatile building block chemistry // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. — 2013. — Vol. 32. — P. 306—319.

119. *Petyuk V. A., Zenkova M. A., Giege R., Vlassov V. V.* Hybridization of antisense oligonucleotides with the 3' part of tRNA^{Phe} // FEBS letters. — 1999. — Vol. 444. — P. 217—221.
120. *Okano H., Katano Y., Baba M., Fujiwara A., Hidese R., Fujiwara S., Yanagihara I., Hayashi T., Kojima K., Takita T., [et al.]*. Enhanced detection of RNA by MMLV reverse transcriptase coupled with thermostable DNA polymerase and DNA/RNA helicase // Enzyme and Microbial Technology. — 2017. — Vol. 96. — P. 111—120.
121. *Левина А., Невинский Г., Лаврик О.* ДНК-ПОЛИМЕРАЗА E.COLI. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СВЯЗЫВАНИЯ ИНИЦИИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА С ПОМОЩЬЮ АНАЛОГОВ ОЛИГОТИМИДИЛАТОВ С ЭТИЛИРОВАННЫМИ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫМИ ФОСФАТНЫМИ ГРУППАМИ // Биоорганическая химия. — 1985. — Т. 11. — С. 358—369.
122. *Zhao W., He X., Hoadley K. A., Parker J. S., Hayes D. N., Perou C. M.* Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling // BMC genomics. — 2014. — Vol. 15. — P. 1—11.
123. *Anderson A. J., Culver H. R., Prieto T. R., Martinez P. J., Sinha J., Bryant S. J., Bowman C. N.* Messenger RNA enrichment using synthetic oligo (T) click nucleic acids // Chemical Communications. — 2020. — Vol. 56. — P. 13987—13990.
124. *Ohtsubo Y., Nagata Y., Tsuda M.* Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase // Scientific reports. — 2017. — Vol. 7. — P.1—10.

Список рисунков

1.1	Схема получения d(TrT)	10
1.2	Первый опубликованный пример синтеза с помощью Н-фосфонатов .	11
1.3	Структуры защищённых азотистых оснований и тритильной защиты, используемых в фосфодиэфирном методе синтеза олигонуклеотидов	12
1.4	Пример синтеза фосфиттриэфирным методом	14
1.5	Пример синтеза фосфитамидным методом на полимерном носителе .	14
1.6	Примеры пептидо-нуклеинового (слева) и морфолинового (справа) незаряженного остова. B_i – азотистое основание	18
1.7	Структуры Р-метилфосфонатных аналогов НК (слева) и фосфорилгуанидиновых аналогов (справа). B_i – азотистое основание	18
1.8	Схема синтеза морфолинового нуклеотидного мономера	20
1.9	Стадии синтеза морфолинового мономера	21
1.10	Схема получения N-фосфитамидного морфолинового мономера; $DMTr$ – диметокситритильная защитная группа	23
1.11	Схема синтетического цикла, предложенный в работе [34], для синтеза морфолиновых олигонуклеотидов с использованием модифицированного фосфитамидного метода	24
1.12	Способ получения мономера с «пептидным» остовом.	26
1.13	Схема автоматического синтеза ПНК методом Мэйфилда и Кори . .	27
1.14	Структуры мономеров для синтеза химерных ПНК-ДНК последовательностей. $MMTr$ – монометокситритильная защитная группа	28
1.15	Синтез Р-метилированного динуклеозида, П. Миллер [29]. B_i – защищённое азотистое основание, Tr – тритильная защитная группа	30
1.16	Синтез Р-метилированного фосфитамидного мономера. B_i – защищённое азотистое основание, $DMTr$ – диметокситритильная защитная группа, $DIPEA$ – диизопропилэтиламин	30
1.17	Получение фосфорилгуанидинового звена в составе олиготимидилата	34
1.18	Профиль ОФХ нативного тринуклеотида (d(TCA)) и содержащего фосфорилгуанидиновую группу. Изображение адаптировано из работы [51].	35

1.19	Спектры кругового дихроизма, полученные при 25 °С для нативного и ФГ-тринуклеотида d(ТСА). Изображение адаптировано из работы [51].	36
1.20	Серия спектров КД для комплементарных ДНК-дуплексов, содержащих нативный или ФГ-декануклеотид. Изображение адаптировано из работы [53].	37
1.21	Схема выделения целевой РНК с помощью ферментативного расщепления рРНК.	43
1.22	Эффективность удаления поли(rA) из раствора при помощи нативного или МО зонда в условиях высокой и низкой ионной силы. Изображение адаптировано из работы 1.22.	45
1.23	Структура «замкнутого» нуклеотидного звена и сравнение гибридизационной способности нативного и «замкнутого» олигонуклеотида [89]	47
1.24	Структура «Zip Nucleic Acid» (ZNA)	48
1.25	Структура dA ^{ChcmP} и dA ^{ChcmP} c3dU. [95]	48
1.26	Распознавание целевой миРНК с помощью праймера, содержащего dA ^{ChcmP} . Изображение адаптировано из работы [95].	49
1.27	Структура нуклеотидной последовательности, содержащей 2'-О-β-D-рибофуранозиладенозин. <i>B_i</i> – азотистое основание.	50
1.28	Схема синтеза кДНК со сменой матричной цепи	51
1.29	Результат капиллярного электрофореза продуктов синтеза кДНК, содержащих адаптерную последовательность. Изображение адаптировано из работы [100]	51
1.30	Структурные формулы дезоксирибогуанозина dG и его структурного изомера iso-dG	52
3.1	Структуры нативной межнуклеотидной фосфатной группы (« ^o ») и модифицированной фосфорилгуанидиновой группы («*»), содержащей остаток N,N,N',N'-замещённого гуанидина («DMI»). . .	61
3.2	Профили ОФХ индивидуальных олигонуклеотидов, содержащих различное число остатков DMI.	65
3.3	Результат электрофореза ФГ-декануклеотидов в денатурирующем 15% ПААГ олигонуклеотидов	66

3.4	Результат электрофореза электронейтральных гомотимидилатов в нативном 15% ПААГ, содержащем SDS	68
3.5	Результат электрофореза электронейтральных гомотимидилатов в денатурирующем 15% ПААГ, содержащем SDS	69
3.6	Масс-спектры олигомеров $X_{1;4;7}$, $X_{2;4;6;8}$, $X_{1-2;5;8-9}$, $X_{1-3;7-9}$, X_{1-9}	71
3.7	Профили спектров оптического поглощения олигомеров X , $X_{1;5;9}$ и $X_{1-3;7-9}$	73
3.8	Результаты термической денатурации комплементарных ДНК-комплексов, образованных ФГ-олигомерами и нативной комплементарной матрицей, в различных солевых условиях.	76
3.9	Структура ненуклеотидной вставки [Bio] после деблокирования.	79
3.10	Масс-спектр биотинового олигонуклеотида N26 ^o	80
3.11	Масс-спектр биотинового олигонуклеотида N26*.	80
3.12	Результат электрофоретического анализа биотиновых ФГО в 15% денатурирующем ПААГ, содержащем SDS	82
3.13	Резонансные структуры, возможные для ФГ-звена, расположенного в межнуклеозидной позиции	83
3.14	Схема внутримолекулярного образования циклического эфира фосфорной кислоты вследствие атаки ОН-группы линкера по атому фосфора ФГ-звена.	84
3.15	Масс-спектры биотиновых ФГ-тримидилатов.	85
3.16	Схема деструкции циклического эфира фосфорной кислоты, содержащего остаток DMI.	86
3.17	Профили ОФХ, полученные после обработки гетеротринуклеотидов $C^oA^*T^o$ -[Bio] и $C^oA^oT^*$ -[Bio] водным раствором аммиака в течение 2 ч или ночи при 56 °С.	87
3.18	Схема удлинения декануклеотида серии X по РНК-матрице rM с образованием флуоресцентного продукта.	90
3.19	Результат электрофоретического разделения продуктов реакций обратной транскрипции для нативного субстрата X/rM.	91
3.20	Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ для ФГ 10-зв. ДНК-праймеров	92
3.21	Предполагаемая вторичная структура фрагмента 18S рРНК человека. J1 и J2 – сайты гибридизации праймеров.	94

3.22	Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ с участием ФГ-праймеров серии J1.	95
3.23	Относительное содержание основных продуктов элонгации праймеров серии J1, a и b , образующихся в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» («St») и пониженной («L») ионной силой.	97
3.24	Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ с участием ФГ-праймеров серии J2.	98
3.25	Относительное содержание основного продукта элонгации праймеров серии J2, образующегося в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» («St») и пониженной («L») ионной силой.	99
3.26	Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ для гомополимерного субстрата T ₂₆ ^o /rA ₆₀ в 15% денатурирующем ПААГ.	102
3.27	Результат электрофоретического разделения продуктов реакции ОТ с участием тупоконечного субстрата rA ₂₆ /dT ₂₆ ^o в 15% денатурирующем ПААГ.	104
3.28	Результат электрофоретического разделения продуктов реакции ОТ с участием dT ₂₆ ^o и «блочной» РНК-матрицы в 15% денатурирующем ПААГ.	106
3.29	Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ для гомополимерного субстрата T ₂₆ /rA ₆₀ в 15% денатурирующем ПААГ.	108
3.30	Результат электрофоретического анализа в 15% денат. ПААГ растворов ON после инкубации с частицами без зонда.	110
3.31	Результат электрофоретического анализа растворов ON после инкубации с зондами J1 ^o , J1 [*] , J2 ^o , J2 [*] , иммобилизованными на частицах сефарозы.	112
3.32	Спектры оптического поглощения растворов красителей до и после инкубации с частицами агарозы, BrCN сефарозы или сефадекса.	113

Список таблиц

1	Способность Р-метилированных олиготимидилатов инициировать ДНК-зависимую ДНК-полимеризацию по матрице poly(dA). Данные адаптированы из работы [49].	33
2	Состав реакционных смесей для ОТ в случае короткой синтетической РНК-матрицы (а) и протяженного фрагмента рРНК (b).	58
3	Структуры исследуемых ФГ-декануклеотидов.	63
4	Структуры электронейтральных ФГ-олиготимидилатов.	68
5	Результаты ESI MS анализа ФГ-декануклеотидов.	72
6	Значения отношений A_{260}/A_{230} и A_{260}/A_{280} для нативного и ФГ-декануклеотидов	74
7	Структуры 3'-биотиновых 26-звенных нативного и ФГ-олигонуклеотидов.	79
8	Значения m/z , соответствующие основным продуктам деструкции N26* – утере нуклеотидного звена [Bio], одного или двух остатков DMI.	80
9	Структуры и теоретические молекулярные массы биотиновых гомо- и гетеротринуклеотидов с различным расположением ФГ-звеньев.	84
10	Структуры праймеров для реакции ОТ с участием высокомолекулярной РНК-матрицы, фрагмента 18S рРНК человека. [Flu] – остаток флуоресцеина.	93
11	Структуры праймеров T ₂₆ [○] , T ₁₃ [○] T ₁₃ [*] , T ₂₆ [*] для реакций ОТ.	101
12	Структуры зондов для иммобилизации на частицы BrCN активированной сефарозы и комплементарных флуоресцентно-меченых НК-мишеней. [Flu] – остаток флуоресцеина. [NH ₂] – нуклеотидная вставка, содержащая алифатическую аминогруппу.	111
13	Значения оптического поглощения на 616 нм для растворов ксиленцианолового синего и 661 нм для растворов метиленового синего.	114