

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

КРАШЕНИНИНА

ОЛЬГА АЛЕКСЕЕВНА

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

02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н. Новопашина Дарья Сергеевна

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список принятых сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ПИРЕНИЛЬНЫХ КОНЬЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	10
1.1. Спектральные и фотохимические свойства пирена как флуоресцентной метки в составе олигонуклеотидов	12
1.2. Методы синтеза монопиренильных олигонуклеотидных зондов и зондов, содержащих два и более остатка пирена.....	19
1.2.1. Введение пирена по гетероциклическому основанию	20
1.2.2. Модификация по 1'-, 2'-, 3'-, 4'- или 5'-положению рибозы	27
1.2.3. Введение пирена в виде нуклеотидных вставок	45
1.3. Перспективы применения пиренильных флуоресцентных зондов.....	51
1.3.1. Детекция нуклеиновых кислот	51
1.3.2. Исследование вторичной и третичной структуры НК	57
1.3.3. Исследование мутаций в ДНК и РНК	60
1.3.4. Агенты для связывания с дцДНК	63
Глава 2. НОВЫЕ ПИРЕНИЛЬНЫЕ ЭКСИМЕР-ОБРАЗУЮЩИЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ ОЛИГО(2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ) ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ РНК (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ).....	66
2.1. Линейные зонды на основе 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-О- метилрибонуклеотидов).....	67
2.1.1. Синтез 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), содержащих «инвертированный» тимидин на 3'-конце	67
2.1.2. Термическая стабильность дуплексов 2'-биспиренильных зондов с РНК и ДНК ..	80
2.1.3. Биологические и физико-химические свойства линейных зондов.....	84
2.2. Тандемные зонды, состоящие из 3'- и 5'-монопиренильных конъюгатов олиго(2'-О- метилрибонуклеотидов).....	95
2.2.1. Рациональный дизайн и химический синтез пирен-меченых тандемных зондов..	95
2.2.2. Термическая стабильность дуплексов тандемных зондов	105
2.2.3. Сравнительное исследование чувствительности флуоресценции пиренильных тандемных зондов к образованию дуплексов с РНК	110
2.2.4. Анализ дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью методом МД	113
2.2.5. Визуализация внутриклеточной РНК-мишени с помощью тандемных зондов ...	117

2.3. Зонды типа «молекулярный маяк» на основе 5'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'- <i>O</i> -метилрибонуклеотидов), содержащих тушитель ВНQ1 на 3'-конце	120
2.3.1. Синтез 5'-биспиренильных производных олиго(2'- <i>O</i> -метилрибонуклеотидов), содержащих тушитель ВНQ1 на 3'-конце	121
2.3.2. Спектральные свойства 5'-биспиренильных зондов и их дуплексов с РНК.....	125
2.3.3. Исследование связывания 5'-биспиренильных зондов типа «молекулярный маяк» с РНК-мишенью	129
2.3.4. Визуализация внутриклеточной РНК-мишени с помощью зондов типа «молекулярный маяк».....	130
Глава 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	133
3.1. Исходные материалы.....	133
3.2. Основные методы работы	135
3.3. Методики эксперимента.....	139
ВЫВОДЫ.....	157
Список литературы.....	158

Список принятых сокращений

В настоящей работе использованы символы и сокращения структурных компонентов нуклеиновых кислот и их производных в соответствии с рекомендациями Комиссии по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и международного союза биохимиков (IUB), а также следующие обозначения:

A - аденозин

B - гетероциклическое основание нуклеозида или нуклеотида

BHQ1, 2, 3 - Black Hole Quenchers 1, 2, 3

BSA – *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамид

Bu^t - третбутил

bz - бензоил

C - цитидин

CPG – стекло с контролируемым размером пор

Cy3 - индокарбоцианин

Cy5 - индодикарбоцианин

DBU – 1,8-дiazобикарбо[5,4,0]ундецен-7

DMAP – 4-*N,N'*-диметиламинопиридин

DMFA – диметилформамид

DMTr- диметокситритил

DTT - дитиотреит

DMSO – диметилсульфоксид

EtOH – этиловый спирт

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

6-FAM – 6-карбоксихлорофлуоресцеин

Fmoc – 9-*H*-флуорен-9-илметоксикарбонил

G - гуанозин

GFP – зеленый флуоресцентный белок

HBTU – *N,N,N',N'*-тетраметил-*O*-(1*H*-бензотриазол-1-ил)урионий гексафторфосфат

ibu – изобутирил

Lcaa-CPG (long chain alkylamino CPG) – CPG с удлиненным алкил аминовым спейсером

LNA (Locked Nucleic Acids) – конформационно ограниченные нуклеиновые кислоты

Me – метил

N^m - 2'-*O*-метилированный нуклеозид

2'-OMe-PS-PHK – фосфотиоатный аналог олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида)

2'-ОМе-РНК – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид)

p – фосфат

PPh₃ - трифенилфосфин

Pу - пиридин

(PуS)₂ - 2,2'-дипиридилдисульфид

T - тимидин

TBDMS – *tert*-бутилдиметилсилильная защитная группа

TEA – триэтиламин

TEX 613, 615 - Texas Red dyes

THF - тетрагидрофуран

TPS - 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид

U - уридин

абс. – абсолютный

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Метод МД – метод молекулярной динамики

МПС – макропористое стекло

НК - нуклеиновая кислота

ОЕ - оптическая единица

офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПААГ - полиакриламидный гель

ПАУ - полиароматические углеводороды

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТСХ - тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовое излучение

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для определения последовательности, структуры, количества и функций НК в клетках все более широкое распространение получают различные методы с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов. В связи с этим дизайн флуоресцентных зондов на основе олигонуклеотидов, обладающих высоким сродством к НК-мишеням, способностью дискриминировать мисматчи в дуплексах с ДНК и РНК, повышенной устойчивостью к действию экзо- и эндонуклеаз и значительной чувствительностью флуоресценции к связыванию с молекулой-мишенью является одной из важнейших задач молекулярной биологии, биотехнологии и биомедицины.

В рамках данной работы в качестве флуоресцентных зондов для детекции протяженных РНК нами были созданы несколько вариантов конструкций на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), а именно: (i) линейные мультипиренильные зонды, содержащие от одной до трех вставок 2'-биспиренилметилфосфодиамидных производных рибонуклеозидов (A, G, U и C), (ii) тандемные зонды, представляющие собой систему из двух монопиренильных конъюгатов, и (iii) «молекулярные маяки», содержащие 5'-концевую биспиренилметилфосфодиамидную группировку и тушитель ВНQ1 на 3'-конце. Выбор именно олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) в качестве основы для РНК-специфичных зондов обусловлен их высоким сродством к комплементарной РНК-мишени и высокой устойчивостью к действию различных нуклеаз. В свою очередь пирен представляет особый интерес среди большого количества различных флуорофоров благодаря своим примечательным физическим и химическим свойствам таким как химическая стабильность, высокий квантовый выход, длительное время жизни флуоресценции, чувствительность флуоресценции пирена к локальному окружению, способность формировать эксимеры (т.е. возбужденные димеры) и эксиплексы (т.е. возбужденные комплексы), а также способность интеркалировать в НК-дуплекс. Все перечисленные свойства пирена подтверждают его привлекательность в качестве флуоресцентной метки при конструировании разнообразных типов флуоресцентных зондов на основе олигонуклеотидов для исследования функций и структурных особенностей НК-мишеней, а также точечных мутаций в составе НК-мишеней.

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

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

1. Разработать метод синтеза конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с одиночными и множественными 2'-биспиренильными группировками и 3'-концевым “инвертированным” тимидином. Получить серию линейных зондов, комплементарных участкам 120-137 и 315-336 мРНК гена *mdr1*. Исследовать физико-химические и биологические свойства 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов).
2. Провести дизайн и синтез тандемных зондов, содержащих два моноспиренильных остатка на стыке компонентов тандема, отличающихся структурой и длиной линкеров и комплементарных участку 2326-2357 28S рибосомальной РНК. Исследовать их физико-химические и биологические свойства.
3. Провести дизайн и синтез зондов типа «молекулярный маяк», содержащих биспиренильную группировку и тушитель ВНQ1 на противоположных концах олигонуклеотидной последовательности и комплементарных участкам 28S рибосомальной РНК. Исследовать их физико-химические и биологические свойства.
4. Исследовать возможность использования новых зондов для детекции протяженных РНК в растворе и визуализации внутриклеточных РНК.

Научная новизна полученных результатов

В работе созданы новые сиквенс-специфичные пиренильные эксимер-образующие флуоресцентные зонды трех типов (линейные, тандемные и зонды типа «молекулярный маяк») на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции РНК. Отобраны высокочувствительные зонды оптимального строения, связывание которых с РНК-мишенью вызывает появление специфического флуоресцентного сигнала эксимера пирена высокой интенсивности. Выявлены структурные особенности предложенных зондов и их комплексов с РНК, влияющие на эффективность образования эксимера пирена и интенсивность эксимерной флуоресценции. На основе данных о термической стабильности комплексов зондов с РНК-мишенями и, в случае тандемных зондов, данных молекулярно-динамических расчетов проведен детальный анализ структуры этих комплексов. Продемонстрирована применимость линейных зондов для детекции протяженной РНК в растворе на примере 678-звенного 5'-концевого фрагмента PGY1/MDR1 мРНК. Продемонстрирована применимость тандемных зондов и зондов типа «молекулярный маяк» для визуализации внутриклеточной РНК на примере 28S рибосомальной РНК в фиксированных клетках линии HEK293 Phoenix.

Практическая значимость работы

Полученные результаты могут быть использованы при создании эффективных инструментов для детекции и визуализации специфических РНК-мишеней, а также могут служить основой для разработки новых высокочувствительных биосенсоров. Разработанные синтетические подходы могут быть адаптированы к синтезу других конъюгатов олигонуклеотидов с целью получения молекулярно-биологических инструментов и терапевтических агентов нового поколения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Созданы новые линейные эксимер-образующие флуоресцентные зонды на основе конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с одиночными и множественными (до трех) 2'-биспиренильными группировками и 3'-концевым «инвертированным» тимидином, комплементарных участкам 120-137 и 315-336 мРНК гена *mdr1*. Выявлено влияние локального окружения модифицированных нуклеотидов, а именно нуклеотидного контекста, на интенсивность эксимерной флуоресценции комплексов зондов с РНК-мишенью.
2. Проведен рациональный дизайн и детальное исследование физико-химических свойств новых эксимер-образующих тандемных зондов, комплементарных участку 2326-2357 28S рРНК, и представляющих собой пару олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 5'- или 3'-концевыми пиренильными остатками на стыке, введенными посредством линкеров различной длины и строения. Выяснено влияние длины линкеров на эффективность образования эксимера пирена при связывании зондов с РНК. Построены МД-траектории и рассчитаны распределения вероятностей образования пиренильных димеров при образовании комплексов тандемных зондов с РНК-мишенью.
3. Созданы новые флуоресцентные зонды типа «молекулярный маяк», представляющие собой олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), комплементарные 28S рРНК, содержащие биспиренильную группировку на 5'-конце и тушитель флуоресценции ВНQ1 на 3'-конце. Проведено сравнительное исследование флуоресценции зондов, различающихся расстоянием биспиренильной группировки от РНК-мишени после образования гибридизационного комплекса.
4. Продемонстрирована возможность визуализации 28S рРНК в клетках с использованием созданных тандемных зондов и зондов типа «молекулярный маяк», что свидетельствует об их перспективности в качестве высокоселективных инструментов детекции внутриклеточных РНК.

Публикации и апробация работы

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

Структура и объем диссертации

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

Личный вклад автора

Все эксперименты и анализ полученных результатов сделаны лично автором, за исключением термической денатурации НК-комплексов, а также расчета МД-траекторий комплексов тандемных зондов с РНК, выполненных совместно с к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН), и визуализации внутриклеточной РНК-мишени, выполненной совместно с к.б.н. В.С. Фишманом (ИЦиГ СО РАН).

Глава 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ПИРЕНИЛЬНЫХ КОНЪЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В настоящее время наиболее удобными и универсальными методами исследования биомолекул являются различные флуоресцентные методы. Использование флуоресцентных методов подразумевает предварительное мечение биомолекул, то есть присоединение к ним флуоресцентной метки. Большое разнообразие задач побудили исследователей к разработке флуорофоров различной химической природы, отличающихся набором физико-химических свойств. Так, для исследования молекулярно-биологических мишеней предложен широкий спектр различных флуоресцирующих меток, таких как органические флуорофоры, квантовые точки (полупроводниковые нанокристаллы, Qdot) и флуоресцирующие белки (например, производные GFP), испускание флуоресценции которых покрывает широкий диапазон длин волн от ближнего УФ- до ближнего инфракрасного диапазона (360-800 нм) (Табл. 1.1.).

Таблица 1.1. Физико-химические характеристики различных флуоресцирующих меток

Флуорофор	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны испускания, нм	Квантовый выход	Молекулярная масса остатка, Да
Флуоресцеин	495	519	0.79 ^{1*}	389
Родамин X (ROX)	570	591	0.70 ^{2*}	548
Cy3	555	570	0.15 ^{3*}	767
Cy5.5	674	694	0.23 ^{2*}	1272
Cy7	750	777	0.30 ^{3*}	818
BODIPY FL	503	509	0.97 ^{1*}	219
SeTau-647	647	693	0.59 ^{2*}	~1300
Пирен	340	378-391	0.32 ^{4*}	202
Перилен	436	450-500	0.94 ^{4*}	252
Qdot® 525	488	525	н/о	н/о, ~15-20 нм
Qdot® 605	350-594	605	н/о	н/о, ~15-20 нм
Qdot® 705	350-633	705	н/о	н/о, ~15-20 нм
EGFP	488	507	0.60 ^{2*}	26 кДа
tdTomato	554	581	0.95 ^{2*}	26 кДа

^{1*} в этаноле [1,2];

^{2*} в фосфатном буфере [3,4];

^{3*} в метаноле [5];

^{4*} в циклогексане [6].

При выборе красителя для флуоресцентного мечения важно подобрать флуорофоры с удобной длиной волны возбуждения и диапазоном испускания флуоресценции, высоким квантовым выходом, большим стоксовым сдвигом, высокой фото- и химической стабильностью, а также, в случае мечения олигонуклеотидов, небольшим размером. Всеми перечисленными свойствами обладает ряд органических флуорофоров, которые могут быть присоединены к биомолекуле посредством ковалентных или нековалентных связей, формируя соответствующие конъюгаты или комплексы. К наиболее востребованным в молекулярной биологии и биомедицине органическим флуорофорам относятся: 1) красители, длины волн максимумов флуоресцентного испускания которых лежат в диапазоне более 500 нм, такие как ксантеновые красители (флуоресцеин, родамин и их производные), цианиновые красители (цианин, производные индокарбоцианина Cy3, Cy5, Cy7 и др.), BODIPY красители и производные сквараина (например, Seta, SeTau), 2) флуорофоры, длины волн максимумов флуоресценции которых не превышают 500 нм, такие как полициклические ароматические углеводороды (антрацен, пирен, перилен и их производные), производные *O*-, *N*- или *S*-содержащих гетероциклических соединений [7].

На сегодняшний день флуоресцентные зонды на основе конъюгатов органических флуорофоров с различными низко- и высокомолекулярными соединениями широко используются для исследования структуры и свойств биомолекул *in vitro* и *in vivo*, в том числе как инструменты молекулярной диагностики, для детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени, а также секвенирования нуклеиновых кислот.

Среди большого числа предложенных органических флуорофоров пирен представляет особый интерес и является привлекательной флуоресцентной меткой благодаря высокой химической стабильности, высокому квантовому выходу, длительному времени жизни флуоресценции, чувствительности флуоресценции пирена к локальному окружению, а также способности формировать эксимеры (т.е. возбужденные димеры) и эксиплексы (т.е. возбужденные комплексы). На данный момент опубликовано большое количество оригинальных работ, посвященных синтезу, изучению свойств и применению флуоресцентных пиренильных производных различных низкомолекулярных соединений, а также биополимеров, таких как пептиды, белки, углеводы и нуклеиновые кислоты (см., например, обзоры [8,9]).

Созданию и исследованию свойств флуоресцентных биосенсоров на основе пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов посвящен данный обзор литературы.

1.1. Спектральные и фотохимические свойства пирена как флуоресцентной метки в составе олигонуклеотидов

Электронный спектр поглощения пирена имеет несколько структурированных полос, соответствующих резонансным переходам 0-0, с выраженными максимумами высокой интенсивности [10]. Спектр поглощения пирена в циклогексане представлен полосами, соответствующими диполь-разрешенным $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам S_4 , S_3 и S_2 с максимумами при 232, 241 (S_4), 262, 273 (S_3), 320 и 333 (S_2) нм; полоса при 371 нм (S_1 переход разрешен по симметрии, но является диполь-запрещенным) с низкой интенсивностью не показана (Рис. 1.1.).

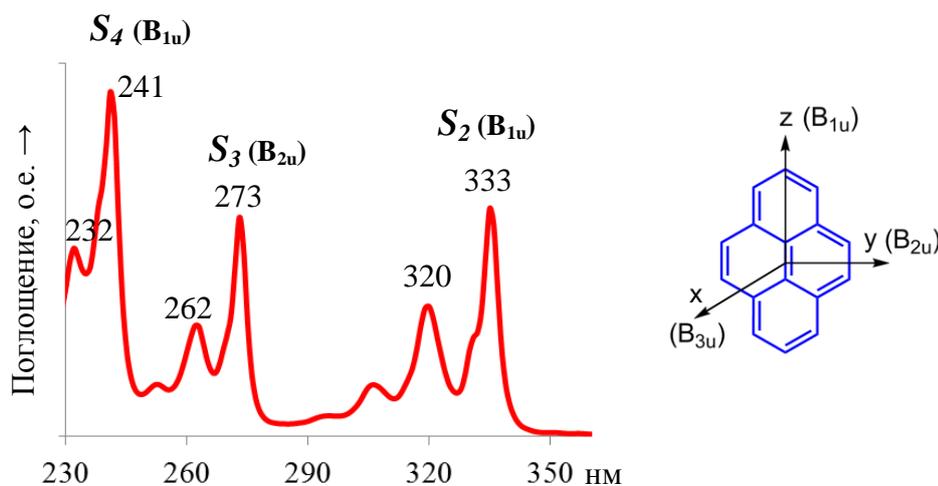


Рис. 1.1. УФ-спектр поглощения пирена в циклогексане [6].

Из литературы известно, что локальное окружение пирена влияет на расположение и интенсивность полос в спектрах электронного поглощения [11,12]. Вследствие гидрофобности и ароматической природы пирена, а также сопоставимого размера с Уотсон-Криковскими парами азотистых оснований (площадь стэкинга пирена $\sim 184 \text{ \AA}^2$, пары А:Т $\sim 223 \text{ \AA}^2$ [13]) остаток пирена склонен вступать в π -стэкинг с гидрофобными ароматическими остатками и интеркалировать в НК-дуплексы. При интеркаляции пирена в ДНК-дуплекс происходит смещение (на 8 нм) в длинноволновую область и уменьшение интенсивности максимумов полос, соответствующих переходам S_2 , по сравнению со спектрами пирена в водном растворе, содержащем 1% додецилсульфата натрия. При этом гидрофобные взаимодействия пирена с бороздками НК-дуплексов приводят к незначительным изменениям спектров поглощения [14].

Кроме того, при образовании пиренильных ассоциатов в спектрах поглощения пирена наблюдается уширение полос по сравнению со спектрами поглощения модельных систем, в которых пирен не участвует в ассоциации с другими молекулами [11,15]. Как и в случае интеркаляции пирена в ДНК, уширение полос а ассоциатах часто сопровождается сдвигом

максимума поглощения в красноволновую область, а также уменьшением молярных коэффициентов поглощения (т.е. наблюдается гипохромизм).

Ковалентное присоединение пиренильного остатка к олигонуклеотидам приводит к исчезновению полос S_4 и S_3 (полоса поглощения олигонуклеотида перекрывает переходы S_4 и S_3), а положение и структура полосы S_2 зависят от окружения пирена.

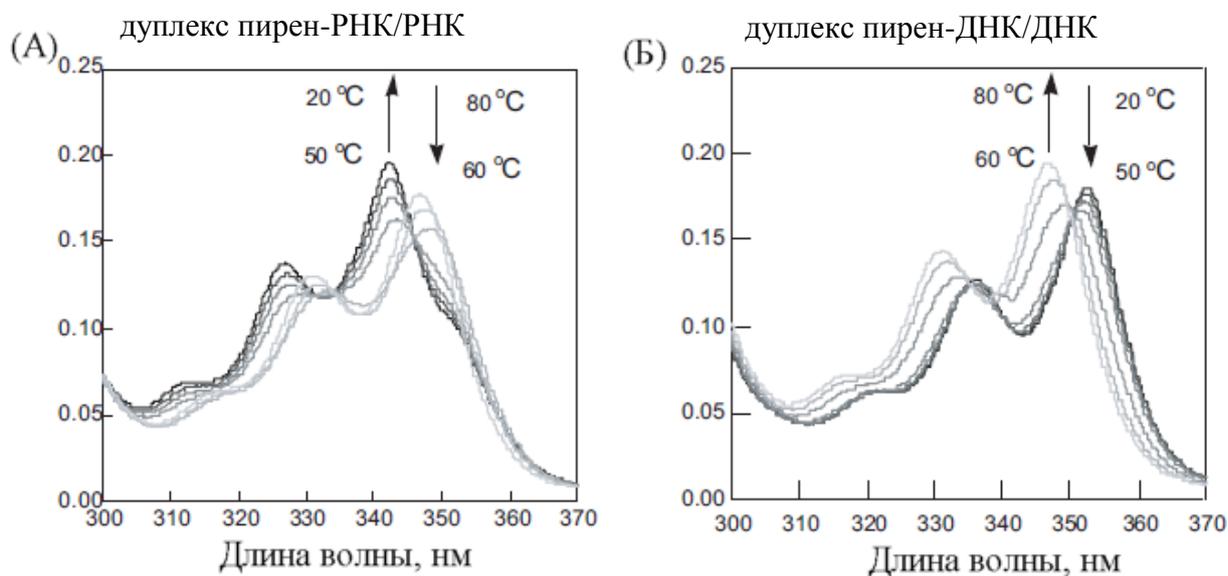


Рис. 1.2. Изменение спектров поглощения пирена в зависимости от температуры для дуплексов (А) олигорибонуклеотида, содержащего вставку 2'-*O*-(1-пиренилметил)уридина, с комплементарной РНК-мишенью (дуплекс пирен-РНК/РНК) и (Б) аналогичного дуплекса пирен-модифицированного олигодезоксирибонуклеотида с ДНК-мишенью (дуплекс пирен-ДНК/ДНК) [12].

Так, например, авторами работы [12] было показано, что при образовании дуплекса олигорибонуклеотида 5'-г(ACA $U^{2'Pyr}$ CCAGUGUUGAU), содержащего вставку 2'-*O*-(1-пиренилметил)уридина ($U^{2'Pyr}$), с комплементарной короткой РНК-мишенью (дуплекс пирен-РНК/РНК) происходит смещение максимума полосы S_2 поглощения пирена в коротковолновую область (347→342 нм). В случае аналогичного пирен-ДНК/ДНК дуплекса, происходят противоположные изменения (347→352 нм) (Рис. 1.2.). С использованием метода ЯМР-спектроскопии было показано, что остаток пирена вытеснен из дуплекса пирен-РНК/РНК, однако, в случае дуплекса пирен-ДНК-ДНК, остаток пирена интеркалирует внутрь дуплекса.

Благодаря соответствующей тонкой структуре колебательных уровней, пирен является одним из ПАУ, демонстрирующих хорошо структурированный спектр мономерной флуоресценции в растворе. Спектр испускания флуоресценции пирена в органических растворителях представлен пятью основными полосами I-V (с максимумами при 372.5, 378.2 (I); 378.9, 379.6 (II); 383.0, 384.0, 388.0 (III), 388.5-392.9 (IV) и 393.0-396.0 (V) нм) (Рис. 1.3.),

однако при конъюгации пирена с другими молекулами уширение полос приводит к тому, что в спектрах испускания флуоресценции, как правило, регистрируют только полосы I и III [16].

Пирен в качестве флуоресцентной метки обладает рядом уникальных свойств, таких как высокий квантовый выход ($\Phi_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}=0.41$ [16]), продолжительное время жизни флуоресценции ($\tau=167$ нс [16]), высокая фотостабильность, чувствительность флуоресценции к локальному окружению, а также способность образовывать эксимеры и эксиплексы [11,15]. Однако, флуоресцентные свойства пирена зависят от нескольких факторов, среди которых стоит отметить полярность окружения, концентрацию, наличие по соседству тушителей флуоресценции [8,16]. Далее мы подробнее рассмотрим влияние всех перечисленных факторов.

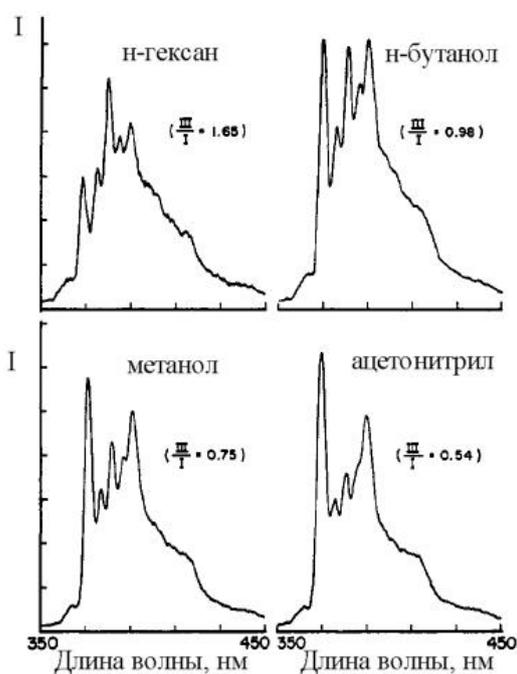


Рис. 1.3. Спектры испускания мономерной флуоресценции пирена в разных растворителях [17]. Концентрация пирена 2 μM , длина волны возбуждения флуоресценции пирена 310 нм.

Было показано, что соотношение интенсивностей полос I и III в спектрах испускания мономерной флуоресценции пирена чувствительно к полярности окружения пиренильных остатков [16,17] (Рис. 1.3.). При увеличении дипольного момента растворителя соотношение интенсивностей полос III и I уменьшается: в среде неполярных насыщенных углеводородов (н-гексан, циклогексан, изооктан) $I_{\text{III}}/I_{\text{I}}$ составляет 1.65-1.75, в случае ароматических углеводородов (бензол, толуол, бензиловый спирт) – 0.80-1.00, а для полярных растворителей (ДМСО, ацетонитрил, метанол, вода) – 0.50-0.80. Это свойство лежит в основе методик, используемых при определении критических концентраций мицеллообразования амфифильных веществ [17]. В случае же пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов значение соотношения $I_{\text{III}}/I_{\text{I}}$ указывает на положение пиренильных остатков в НК-дуплексах вследствие разной полярности бороздок дуплекса (более полярное окружение) и азотистых оснований в кóре дуплекса (неполярное окружение) [8]. Как упоминалось выше, для пирена свойственно

продолжительное время жизни флуоресценции (~200-400 нс в зависимости от среды). Это обусловлено тем, что переход S_1 (см. раздел 1.1.1.), соответствующий наименьшей энергии возбуждения, является диполь-запрещенным. Это приводит к тому, что флуоресценция пирена очень чувствительна к присутствию тушителей. В большинстве описанных работ ковалентное присоединение остатков пирена к биомолекулам осуществляют через 1-положение. Природа линкера, посредством которого пирен вводят в другие молекулы, оказывает значительное влияние на положение и интенсивность полос в спектрах испускания флуоресценции и на время жизни флуоресценции пирена. Было выяснено, что увеличение полярности линкера приводит к уменьшению соотношения I_{III}/I_I , а также сильно уменьшает время жизни флуоресценции пирена (до 30 раз) [16].

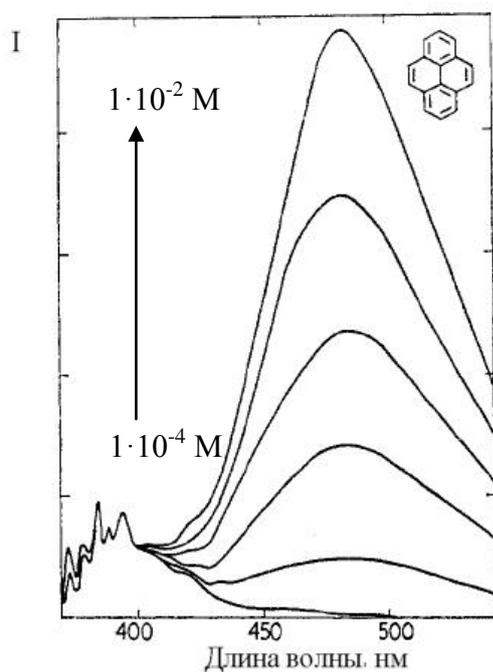


Рис. 1.4. Спектры испускания флуоресценции пирена в циклогексане [15]. Интенсивность эксимерной флуоресценции (максимум при 480 нм) возрастает при увеличении концентрации пирена от $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ до $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, длина волны возбуждения флуоресценции пирена 310 нм.

Кроме того, спектр флуоресценции пирена чувствителен к изменению концентрации пирена в растворе. Так, например, увеличение концентрации пирена в циклогексане до $0.9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ приводит к появлению в спектре испускания флуоресценции новой широкой неструктурированной полосы с максимумом в районе 480 нм, свидетельствующей об образовании эксимеров (т.е., «возбужденных димеров») (Рис. 1.4.). Эксимеры, по определению Birks [15], представляют собой димеры, ассоциированные в возбужденном состоянии и склонные к диссоциации в основном состоянии. Эксимеры ($1D^*$) образуются, когда фотовозбужденный остаток пирена ($1M^*$; мономер) соударяется с остатком пирена в основном состоянии ($1M$). Формирование эксимера может быть представлено схематически следующим образом: $1M^* + 1M \leftrightarrow (1M^* \cdot 1M) \leftrightarrow 1D^*$. Это взаимодействие приводит к расщеплению энергетических уровней и последующему появлению излучательного перехода с энергией

более низкой, чем у мономера пирена (появляется сдвинутая в красноволновую область широкая неструктурированная полоса).

Спектры возбуждения флуоресценции пирена, зарегистрированные при фиксированных длинах волн испускания флуоресценции, представляют неопровержимые доказательства взаимодействия остатков пирена при образовании эксимера [11,18].

Спектры возбуждения, зарегистрированные с использованием длин волн испускания мономера (380 нм) и эксимера (480-500 нм) пирена, значительно отличаются. Несмотря на то, что они имеют общие черты, они не могут быть наложены друг на друга (Рис. 1.5.).

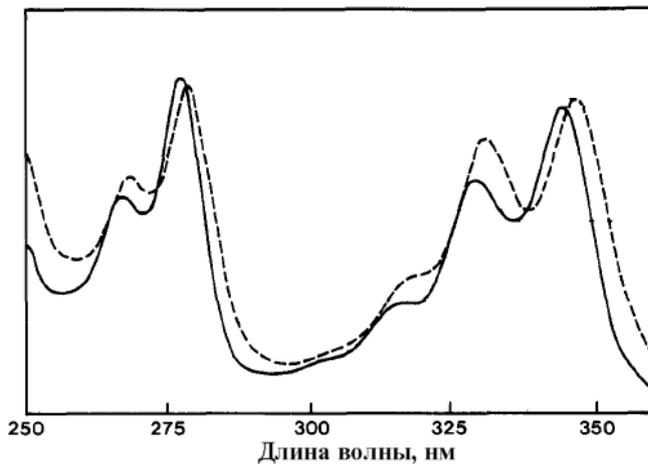


Рис. 1.5. Спектры возбуждения флуоресценции пирен-меченой гидроксипропилцеллюлозы в воде, записанные с использованием длин волн испускания мономера (380 нм, сплошная линия) и эксимера (480-500 нм, пунктирная линия) пирена [11].

Спектры, записанные с использованием длин волн испускания эксимерной флуоресценции, сдвинуты в длинноволновую область (1-4 нм), а полосы в них шире, по сравнению со спектрами, записанными при испускании мономерной флуоресценции [11]. Аналогичные закономерности наблюдали при регистрации спектров возбуждения пирен-модифицированных олигонуклеотидов в работе [18] (Рис. 1.6.).

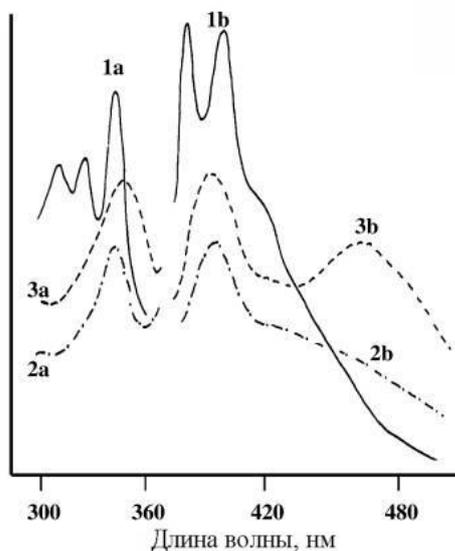


Рис. 1.6. Спектры возбуждения (a) и испускания (b) флуоресценции 1-пиренилметиламина в этаноле (1) и олигонуклеотида d(GACCTCGCGCTCCTTG), содержащего один (2) или два (3) остатка пирена на 5'-конце в водном растворе [18].

Стоит отметить, что относительное расположение остатков пирена сильно влияет на их способность образовывать эксимер. Показано, что для эффективного образования эксимера молекулы пирена должны быть ориентированы параллельно и межпланарное расстояние должно быть 3-4 Å [15,19]. Кроме того, при эффективном образовании эксимера пирена квантовый выход испускания эксимерной флуоресценции значительно превышает квантовый выход испускания мономерной флуоресценции [15]. Свойство пирена образовывать эксимеры лежит в основе ряда методов детекции и исследования структурных особенностей различных биомолекул (см., например, [20]).

В присутствии тушителей флуоресценция пирена может подвергаться тушению вследствие 1) обратимого окисления/восстановления в основном или в возбужденном состоянии, 2) переноса заряда или 3) переноса энергии (см., например, [21]). Механизмы тушения флуоресценции пирена, ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду, были подробно исследованы в работе [22]. Было показано, что в олигонуклеотиде соседние азотистые основания могут тушить флуоресценцию пирена при 400 нм посредством фотоиндуцированного переноса электронов к/от соседних азотистых оснований, причем способность к тушению флуоресценции пирена возрастает в ряду $A < G < T < C$. Вероятно, в случае взаимодействия с соседними нуклеотидами G пирен подвергается восстановлению, а в случае нуклеозидов T, U и C – окислению. В случае же НК-дуплексов было показано, что наиболее эффективными тушителями флуоресценции пирена являются нуклеотиды C и T вне зависимости от того, находятся ли они в той же цепи, что и модифицированное пиреном звено, или в комплементарной цепи. Таким образом, при дизайне олигонуклеотидных конструкций важно выбрать такое положение мечения олигонуклеотида пиреном, при котором пиренильный остаток будет располагаться в бороздках НК-дуплексов, а не интеркалировать внутрь дуплекса [8].

Фотофизические свойства пирена могут быть изменены посредством электронного сопряжения с азотистым основанием или дальнейшего расширения π -системы флуорофора присоединением алкинильных линкеров. Наиболее простым вариантом электронного сопряжения флуорофора с азотистым основанием является введение 1-пиренильного остатка в C5-положение 2'-дезоксинуридина [23] или в C8-положение 2'-деоксиаденозина [24], в результате которого при фотовозбуждении пирена происходит внутримолекулярный перенос заряда на азотистое основание с появлением в спектре флуоресценции широкой неструктурированной полосы, смещенной в красноволновую область. Интересно, что при введении 1-пирена в C5-положение 2'-дезоксцитидина [25] или 2-пирена в C5-положение 2'-дезоксинуридина [26] подобного электронного сопряжения флуорофора с азотистым основанием не происходит.

Наиболее распространенным вариантом расширения π -системы пирена является присоединение этинильных линкеров, что приводит к bathochromному сдвигу полос возбуждения (до ~40 нм) и испускания (до ~80 нм) флуоресценции, а также к значительному увеличению квантового выхода испускания флуоресценции этих красителей по сравнению с другими замещенными производными пирена (см., например, [27]). Стоит отметить, что в случае присоединения пиренильного остатка к азотистому основанию через этинильный линкер сохраняется способность к фотовозбужденному переносу заряда на азотистое основание, а также к образованию возбужденных димеров [28].

Рассмотренные выше фотофизические свойства пирена подтверждают его привлекательность в качестве флуоресцентной метки при конструировании разнообразных типов флуоресцентных зондов на основе олигонуклеотидов для детекции различных взаимодействий с участием нуклеиновых кислот, для исследования функций, структурных особенностей или точечных мутаций в составе НК-мишеней.

1.2. Методы синтеза монопиренильных олигонуклеотидных зондов и зондов, содержащих два и более остатка пирена

Дизайн и синтез флуоресцентных олигонуклеотидных зондов, содержащих одну или несколько пиренильных меток, является весьма актуальным направлением исследований в настоящее время. Опубликовано большое количество работ, посвященных созданию и применению пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов для разработки различных систем флуоресцентного гибридизационного анализа НК (см., например [8]). Как отмечалось ранее, флуоресценция пиренильного остатка, присоединённого к олигонуклеотиду, может подвергаться тушению соседними гетероциклическими основаниями, причем степень тушения зависит от положения пирена в НК-дуплексе, поэтому при дизайне флуоресцентных зондов важен выбор типа модификации, длины и структуры линкера между пиреном и олигонуклеотидом, а также типа олигонуклеотида как основы зонда. Введение пиренильного остатка в олигонуклеотид оказывает влияние также на термическую стабильность его дуплекса с НК-мишенью. Так, например, в ряде случаев в связи с интеркаляцией пирена в структуру дуплекса введение пиренильного остатка в нетерминальные положения может приводить к стабилизации дуплекса. Однако, если модифицированное пиреном звено олигонуклеотида препятствует образованию Уотсон-Криковских пар или значительно искажает структуру дуплекса, то происходит дестабилизация дуплексов. В случае же введения пирена в терминальные положения олигонуклеотида стабилизация дуплекса может происходить благодаря стэкингу пиренильного остатка с гетероциклическими основаниями концевых нуклеозидов дуплекса [8].

На данный момент подходы к синтезу пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов весьма разнообразны и позволяют получить производные, содержащие остатки пирена, введенные по гетероциклическому основанию, 1'-, 2'-, 3'-, 4'- и 5'-положению рибозы, межнуклеозидным фосфатам или в составе ненуклеотидной вставки (см. далее). Это позволяет выбрать наиболее эффективный способ синтеза в зависимости от поставленной задачи.

В настоящее время можно выделить два основных подхода к синтезу пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов: пре- и постсинтетический подходы. Пресинтетический подход подразумевает первоначальное получение пирен-модифицированных синтонов с последующим введением их в олигонуклеотид в ходе твердофазного синтеза. Постсинтетический подход подразумевает введение остатков пирена в предварительно синтезированный олигонуклеотид, содержащий соответствующую реакционноспособную группу. При этом присоединение пирена можно проводить как в твердофазном варианте с использованием полимерсвязанного

защищенного олигонуклеотида, так и в растворе после удаления защитных групп.

В следующем разделе описаны некоторые примеры наиболее распространённых методов синтеза пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов и их свойства.

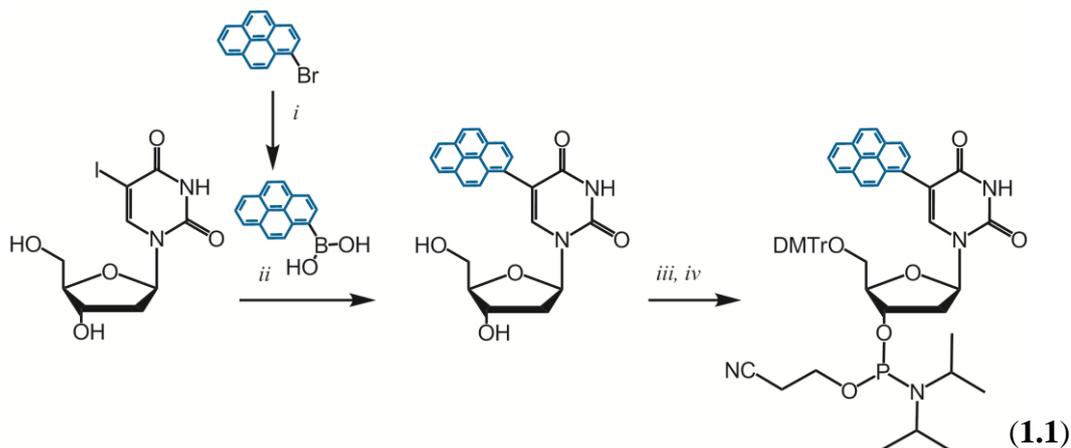
1.2.1. Введение пирена по гетероциклическому основанию

Введение пирена по гетероциклическому основанию является одной из наиболее часто встречающихся модификаций, описанных в литературе. Повышенный интерес к таким модификациям вызван в первую очередь тем, что остаток пирена может служить в качестве фотоиндуцируемого донора электронов для азотистых оснований (см., например, работы группы Wagenknecht [23–26,29]), а также тем, что остаток пирена взаимодействует с большой бороздкой или интеркалирует внутрь НК-дуплекса, что служит основой для дизайна ряда флуоресцентных зондов для детекции однонуклеотидных замен (мисматчей) в НК-мишенях.

Наиболее простым и распространенным методом синтеза конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих пиренильные остатки, введенные по гетероциклическому основанию, является применение палладий-катализируемых реакций (реакции Соногаширы, Хека, Сузуки-Мияура) в рамках пресинтетического подхода (см., например, [23,30–37]).

На схеме 1.1 представлен один из наиболее простых подходов к синтезу C5-замещенного 2'-дезоксисуридина, в основе которого лежит реакция Сузуки-Мияура, позволяющий получить целевой пирен-модифицированный фосфитамида с высоким выходом [23].

Схема 1.1



(i) 1) *n*-Бутил-литий, Et₂O, 0 °С, 30 мин; 2) В(ОСН₃), -78 °С, 6 ч, затем 25 °С, 20 ч; 3) Н₃О⁺, 25 °С, 3 ч; (ii) пирен-1-илборная кислота, [Pd(PPh₃)₄], NaOH, THF/CH₃OH/H₂O, 20 ч; (iii) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 25 °С, 16 ч; (iv) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH₂Cl₂, 25 °С, 12 ч [23].

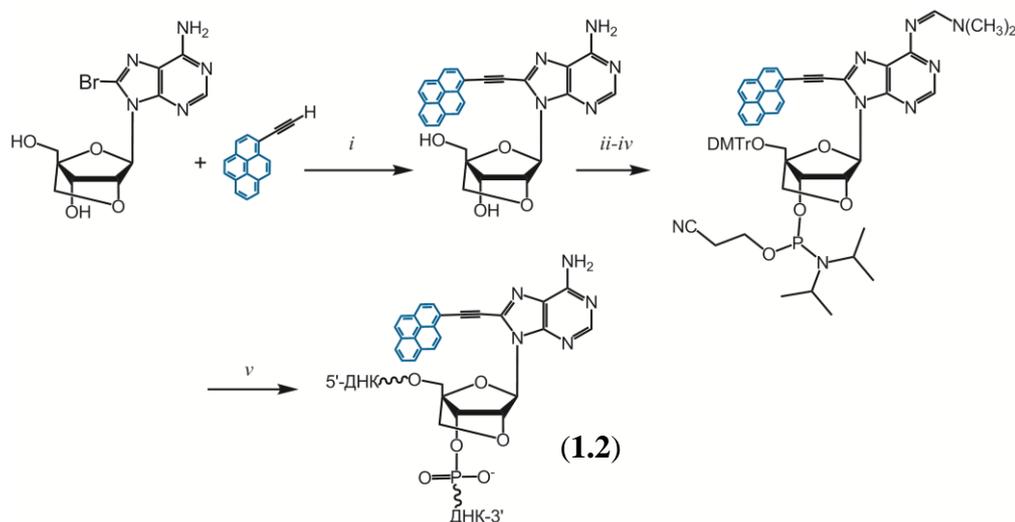
С использованием полученного фосфитамида (1.1) была синтезирована серия пирен-модифицированных олигонуклеотидов, спектральные свойства которых были детально изучены. Было продемонстрировано, что при возбуждении флуоресценции пирен является

донором электронов для электроотрицательного урацила, в результате образуется внутримолекулярный эксиплекс P_{yr}-dU, спектр испускания которого представлен широкой неструктурированной полосой с максимумом при 490-500 нм. Было отмечено, что флуоресценция этого эксиплекса зависит от полярности растворителя и pH среды. С помощью спектров оптического поглощения P_{yr}-dU, зарегистрированные через 10 пс после возбуждения флуоресценции, было показано, что перенос заряда от этого комплекса может происходить только на соседние тимины той же цепи [23].

Кроме описанного выше, было предложено несколько похожих простых подходов, подразумевающих введение пирена по гетероциклическому основанию через этинильный линкер, с использованием C5-галоген-замещенных пиримидиновых или C8-галоген-замещенных пуриновых нуклеозидов (см., например, [31–37]). Такая модификация весьма популярна среди исследователей, так как введение пирена через этинильный линкер приводит к батохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции. При этом, как и в случае с нулевым линкером, при фотовозбуждении пирен является донором электрона для азотистых оснований.

На схеме 1.2 в качестве примера продемонстрирован один из предложенных вариантов синтеза нуклеотидных синтонов на основе LNA с введенным по гетероциклическому основанию пиреном через этинильный линкер [38].

Схема 1.2



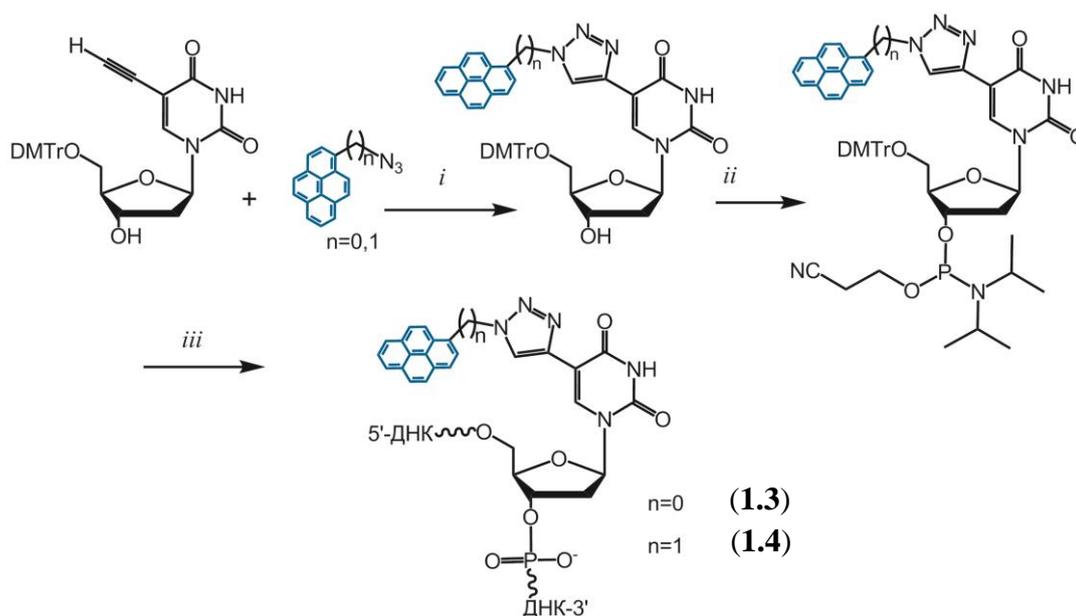
(i) [Pd(PPh₃)₄], CuI, DMF, Et₃N, 50 °C; (ii) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; (iii) (CH₃)₂NCH(OCH₃)₂, DMF, 50 °C; (iv) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамид, диизопропилэтиламин, CH₂Cl₂, 25 °C; (v) 1) автоматический фосфитамидный синтез олигонуклеотида; 2) NH₄OH, 55 °C [38].

Спектры оптического поглощения олигодезоксирибонуклеотидов (1.2), содержащих вставки C8-пиренилэтинил-замещенного LNA аденозина, и их дуплексов с комплементарной

или содержащей мисматч ДНК-мишенью весьма похожи и содержат структурированную полосу с максимумом при ~420 нм и плечами при ~385 нм и ~400 нм. Спектры испускания флуоресценции этих олигонуклеотидов с комплементарной или содержащей мисматч ДНК-мишенью (длина волны возбуждения 385 нм) были представлены одной широкой неструктурированной полосой с максимумом при ~460 нм, что говорит о сильном электронном сопряжении остатка пирена с аденином [38].

Интересный альтернативный вариант получения C5-пирен-замещенного 2'-дезоксиридина был предложен в работе [39]. Подход подразумевает присоединение 1-азидопирена или 1-азидометилпирена посредством Cu(I)-катализируемого 1,4-циклоприсоединения по Хьюсгену-Мельдалю-Шарплессу к C5-этинил-замещенному 2'-дезоксиридину (Схема 1.3).

Схема 1.3



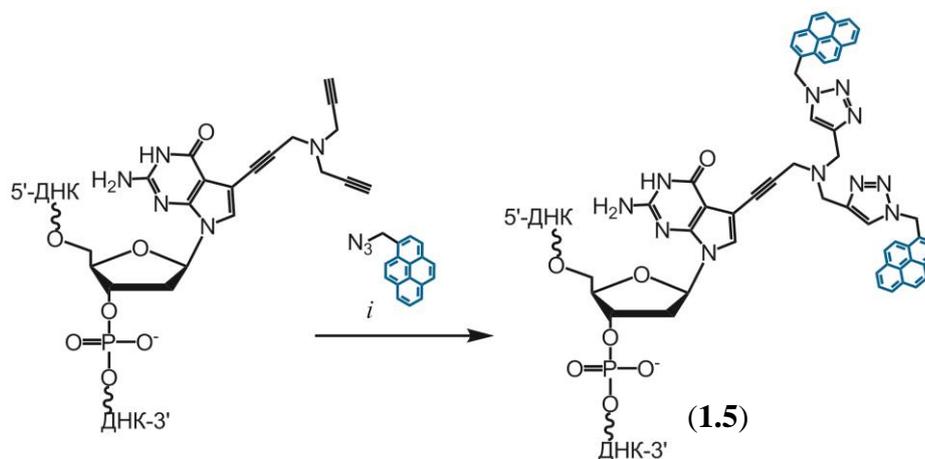
(i) Аскорбат Na, CuSO₄, THF/*mpem*-C₄H₉OH/H₂O; (ii) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH₂Cl₂, 25 °C, 12 ч; (iii) 1) автоматический фосфитамидажный синтез олигонуклеотида; 2) NH₄OH, 55 °C [39].

Авторы предположили, что введение пирена через короткий жесткий линкер будет способствовать точному позиционированию остатка пирена в НК-дуплексе, что приведет к созданию чувствительных флуоресцентных зондов для детекции мисматчей ДНК. Действительно, при гибридизации олигонуклеотидов типа (1.3) (n=0) с комплементарной ДНК-мишенью происходило увеличение интенсивности флуоресценции (до 2-5 раз при 382 нм, длина волны возбуждения 344 нм) и, напротив, гибридизация этих зондов с ДНК-мишенью, содержащей однонуклеотидную замену, приводила к снижению флуоресцентного сигнала. По всей видимости, при образовании совершенного дуплекса зонда с ДНК-мишенью остаток

пирена располагается в большой бороздке дуплекса, в то время как при образовании несовершенного дуплекса пирен способен интеркалировать внутрь дуплекса, при этом его флуоресценция подвергается тушению. Небольшое изменение в структуре линкера ($n=0 \Rightarrow n=1$) привело к созданию зондов типа (1.4) с совершенно другими свойствами. Гибридизация этих зондов с комплементарной ДНК-мишенью приводила к значительному увеличению интенсивности флуоресценции (от 9 до 23 раз при 377 нм, длина волны возбуждения - 344 нм), однако, они оказались практически не чувствительны к однонуклеотидным заменам в ДНК-мишени (кроме замены на гуанин, благодаря эффективному восстановительному тушению флуоресценции пирена) [39].

Постсинтетический подход не столь распространен для введения модификаций по гетероциклическому основанию. Примером такого подхода к синтезу пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов может служить метод, описанный в работе [40] и позволяющий получить пирен-меченые зонды весьма оригинального дизайна. Метод основан на Cu(I)-катализируемом 1,4-циклоприсоединении 1-азидометилпирена к олигонуклеотиду, содержащему алкин-производное C7-дезагуанозина (Схема 1.4).

Схема 1.4



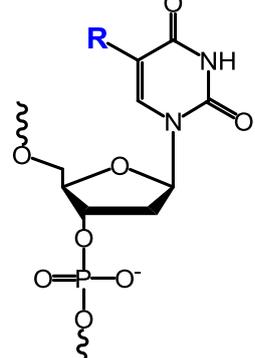
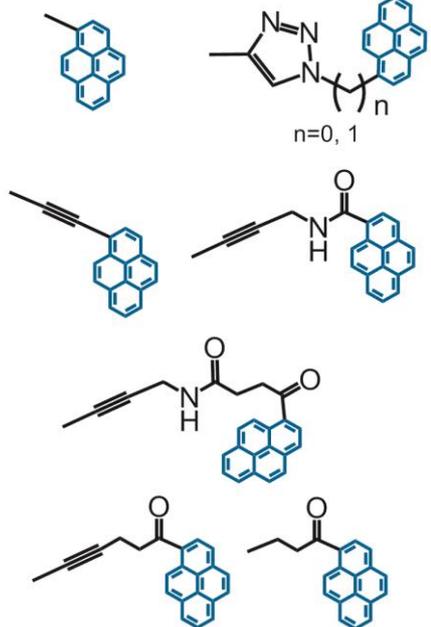
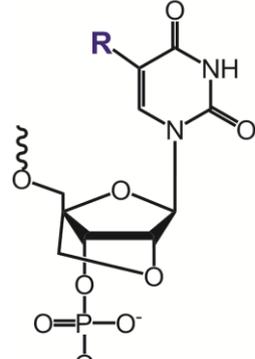
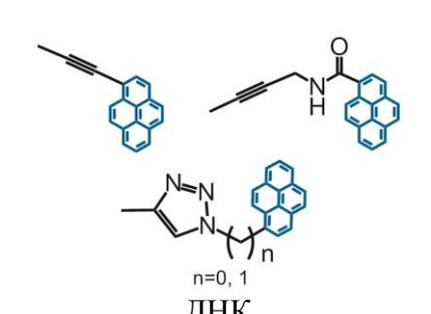
(i) 1-Азидометилпирен, аскорбат Na, CuSO₄, THF/*mpem*-C₄H₉OH/H₂O [40].

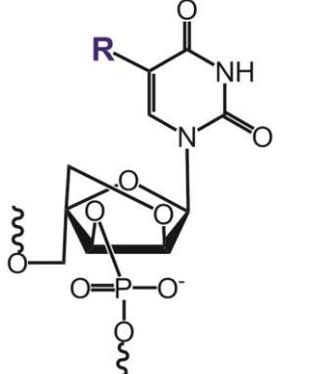
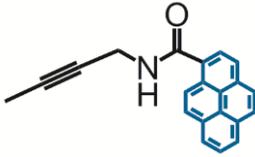
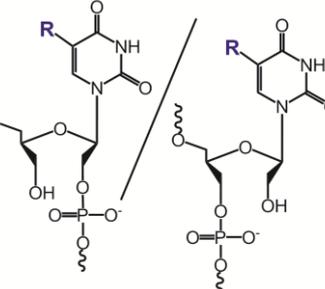
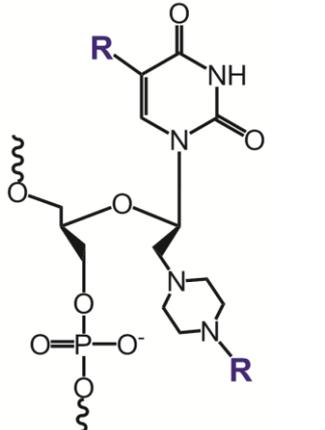
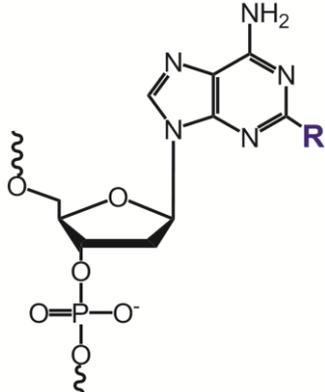
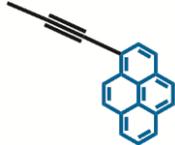
Введение по гетероциклическому основанию разветвленной боковой цепи, декорированной двумя проксимальными остатками пирена, приводит к увеличению термической стабильности дуплексов зондов (1.5) с ДНК-мишенью. Расчеты молекулярной динамики этих комплексов указывают на то, что остатки пирена не нарушают структуру дуплекса зондов с ДНК-мишенью, располагаясь в большой бороздке дуплекса. Стоит отметить, что появление сигнала эксимерной флуоресценции этих зондов регистрировали только в случае гибридизации зондов с мишенью, содержащей соседнюю пиренильную репортерную группу [40].

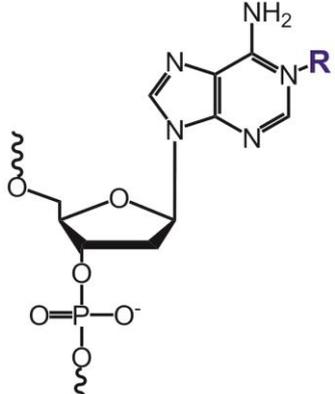
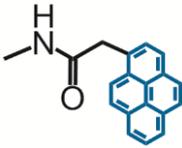
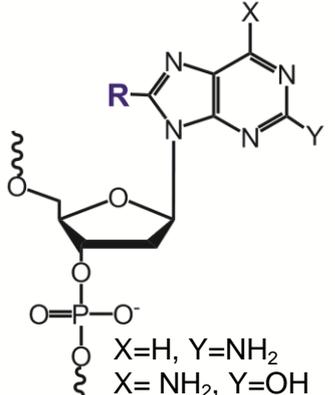
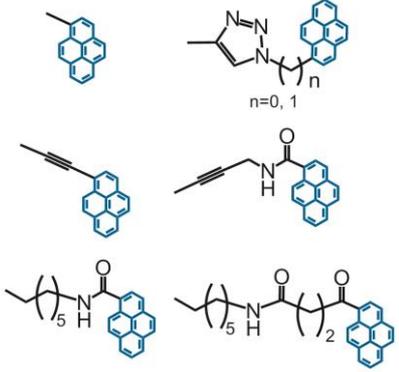
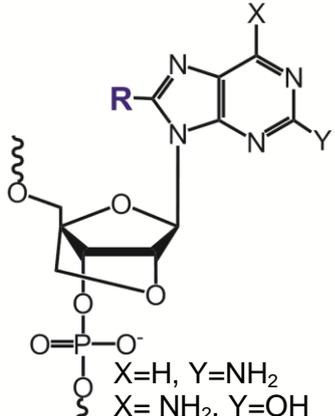
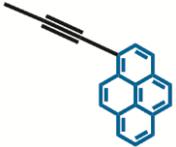
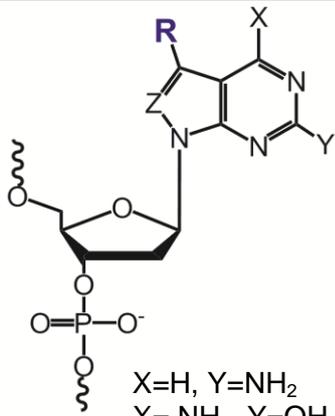
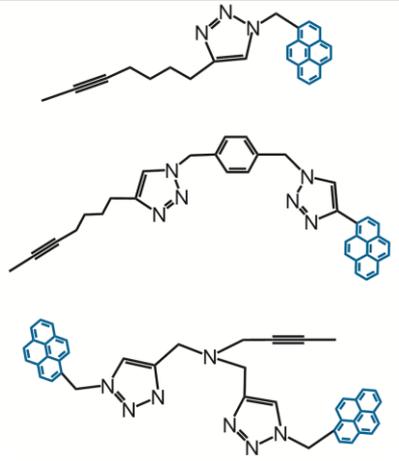
Анализируя опубликованные данные, можно сделать вывод, что присоединение остатка пирена к гетероциклическому основанию через короткие жесткие линкеры, как правило, приводит к дестабилизации дуплексов зондов с НК-мишенями по сравнению с немодифицированными НК-дуплексами (см., например, [23,36,38,39,41]). Напротив, при использовании длинного и гибкого линкера пирен может интеркалировать в дуплекс или располагаться в большой бороздке дуплекса, не нарушая структуру дуплекса и увеличивая термическую стабильность [40,42,43].

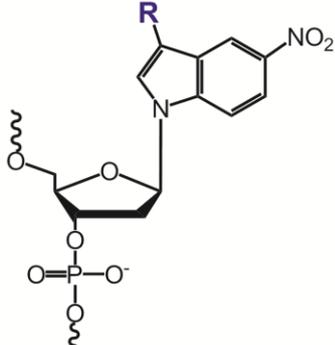
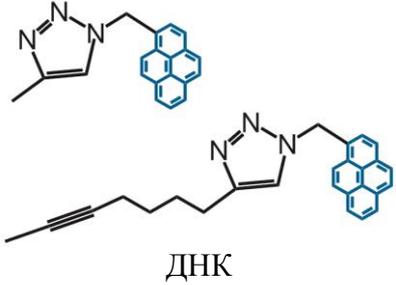
К настоящему времени в литературе описано большое разнообразие флуоресцентных олигонуклеотидных зондов, содержащих пиренильные остатки, введенные по гетероциклическому основанию, некоторые из которых представлены в таблице 1.2.

Таблица 1.2. Структуры конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих пиренильные остатки, введенные по гетероциклическому основанию

Фрагмент структуры конъюгата	Структура R, тип олигонуклеотида	Положение пирена в НК-дуплексе	Ссылка
	 <p style="text-align: center;">ДНК</p>	<p>Большая бороздка или интеркаляция внутри НК-дуплекса</p>	<p>[23,30,32–36,39,44–50]</p> <p>[43]</p> <p>[51]</p>
	 <p style="text-align: center;">ДНК</p>	<p>Большая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[38,52,53]</p>

	 <p>ДНК</p>	Большая бороздка НК-дуплекса	[54]
	 <p>ДНК</p>	Большая бороздка или интеркаляция внутри НК- дуплекса	[55]
	 <p>ДНК</p>	Большая бороздка НК-дуплекса	[56]
	 <p>РНК</p>	Большая бороздка НК-дуплекса	[57]

 <p>Chemical structure of a nucleotide with an amino group (NH_2) and an R group on the base.</p>	 <p>Chemical structure of a nucleotide with a fluorenyl group.</p> <p>ДНК</p>	<p>Большая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[58]</p>
 <p>Chemical structure of a nucleotide with substituents X and Y on the base.</p> <p>$\text{X}=\text{H}, \text{Y}=\text{NH}_2$ $\text{X}=\text{NH}_2, \text{Y}=\text{OH}$</p>	 <p>Chemical structures of nucleotides with fluorenyl and alkyne groups.</p> <p>ДНК</p>	<p>Интеркаляция внутри или большая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[24,34,35, 38,46,59– 63]</p>
 <p>Chemical structure of a nucleotide with substituents X and Y on the base.</p> <p>$\text{X}=\text{H}, \text{Y}=\text{NH}_2$ $\text{X}=\text{NH}_2, \text{Y}=\text{OH}$</p>	 <p>Chemical structure of a nucleotide with a fluorenyl group and an alkyne group.</p> <p>ДНК</p>	<p>Большая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[38]</p>
 <p>Chemical structure of a nucleotide with substituents X, Y, and Z on the base.</p> <p>$\text{X}=\text{H}, \text{Y}=\text{NH}_2$ $\text{X}=\text{NH}_2, \text{Y}=\text{OH}$ $\text{Z}=\text{CH}, \text{N}$</p>	 <p>Chemical structures of nucleotides with fluorenyl groups and alkyne groups.</p> <p>ДНК</p>	<p>Большая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[40,42,64]</p>

	 <p style="text-align: center;">ДНК</p>	<p>Интеркаляция внутри или большая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[65]</p>
---	--	---	-------------

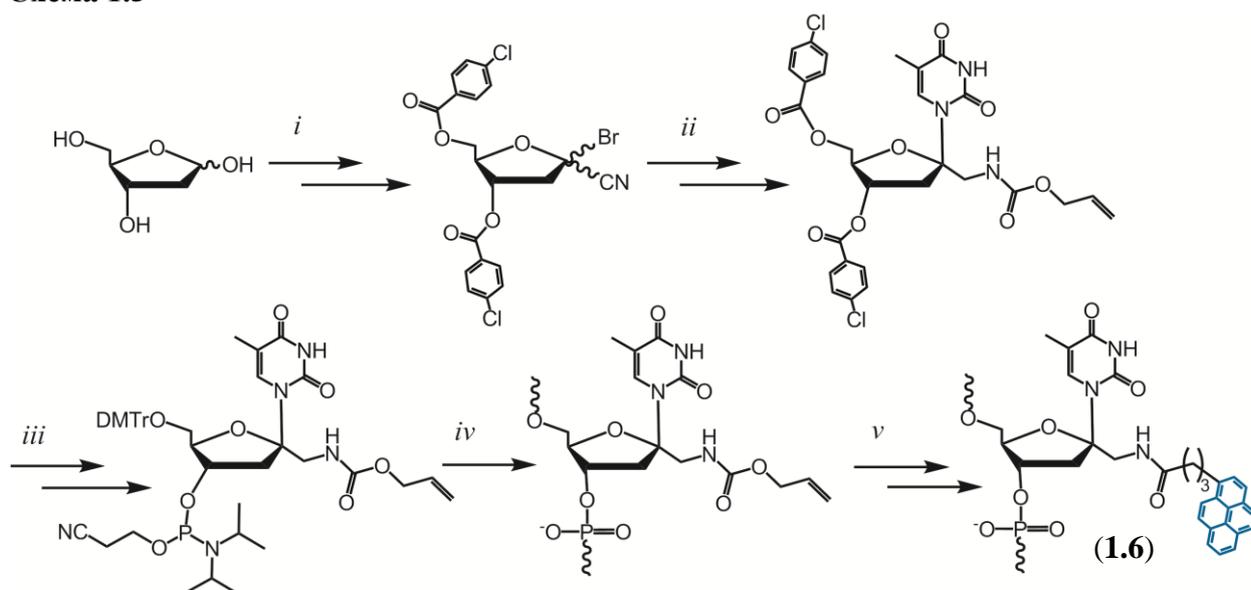
1.2.2. Модификация по 1'-, 2'-, 3'-, 4'- или 5'-положению рибозы

В литературе описаны производные олигонуклеотидов, содержащие остатки пирена, введенные по всем возможным 1'-, 2'-, 3'-, 4'- и 5'-С-положениям рибозы. Далее по порядку рассмотрим методы синтеза пиренильных конъюгатов по каждому из положений рибозы и их свойства.

1.2.2.1. Модификация по 1'-положению рибозы и замена азотистого основания на остаток пирена

Модификация по 1'-положению рибозы является очень редким вариантом введения пиренильного остатка в олигонуклеотид. На данный момент описаны лишь два подхода к синтезу 1'-пирен-меченых олигонуклеотидов и оба они осуществлены в постсинтетическом варианте [66,67]. Оба подхода подразумевают предварительный синтез олигонуклеотидов, содержащих 1'-аминолинкер, и последующее ацилирование аминогруппы активированными производными 1-пиренбутановой кислоты. В качестве примера на схеме 1.5 представлена синтетическая стратегия, описанная авторами работы [67].

Схема 1.5



(i) 1) HCl, CH₃OH, 2) *n*-ClBzCl, пиридин, 3) HCl, AcOH; (ii) 1) триметилсилилцианид, BF₃·OEt₂; 2) *N*-бромсукцинимид, бензоилпероксид, CCl₄; 3) 2,4-*O*-(триметилсилил)-тимин, Hg(CN)₂, CH₃CN; (iii) 1) NaBH₄, трифторуксусная кислота, THF; 2) аллилоксикарбонилхлорид, THF; 3) NaOCH₃, CH₃OH; 4) 4,4'-диметокситритилхлорид, DMAP, Et₃N, THF; 4) 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропилхлорофосфитамида, диизопропилэтиламин, CH₂Cl₂; (iv) автоматический фосфитамидажный синтез олигонуклеотида; (v) 1) [Pd(PPh₃)₄], [NEt₂H₂][HCO₃], DMF, микроволновое излучение 200 Вт, 80 °С, 10 мин; 2) 1-гидроксипиренбутириловый ангидрид, НВТУ, диизопропилэтиламин, 1-пиренбутановая кислота, DMF, микроволновое излучение 150–200 Вт, 80 °С, 10 мин; 3) NH₄OH, 25 °С [67].

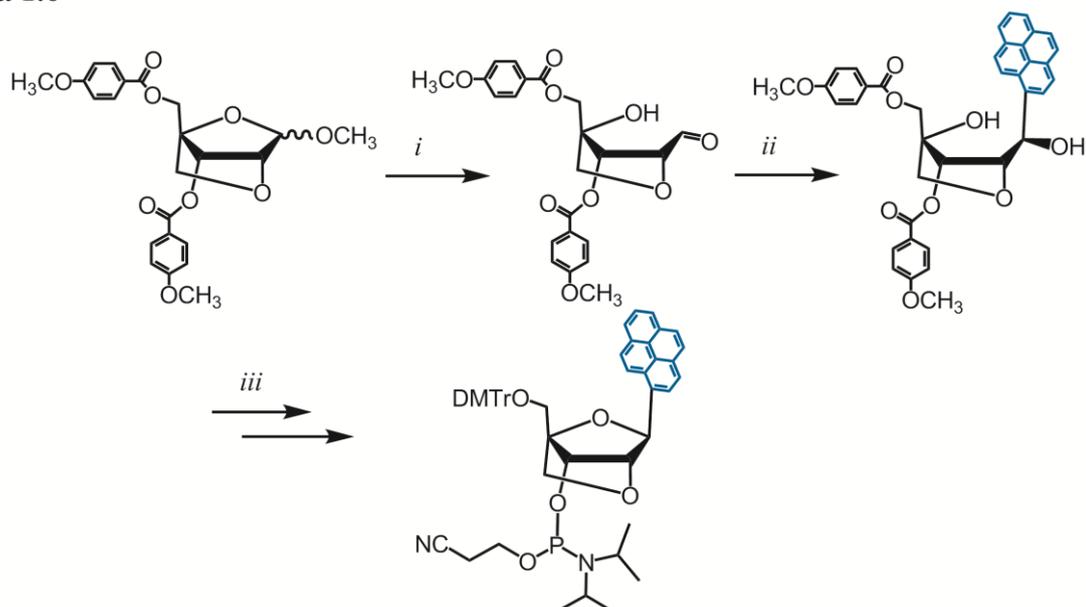
Дуплексы олигонуклеотидов, содержащих один или два 1'-модифицированных нуклеотида (1.6), с комплементарной ДНК-мишенью обладали заметно большей термической стабильностью по сравнению с немодифицированным ДНК-дуплексом, что, по мнению авторов, связано с тем, что остатки пирена располагаются в малой бороздке ДНК-дуплекса, не внося дополнительных стерических препятствий [67].

В отличие от модификации по 1'-положению рибозы, замена азотистого основания на остаток пирена является весьма распространенной модификацией. С тех пор как производные олигонуклеотидов с такими звеньями были предложены Коол и соавторами [68,69], они были детально изучены, например, как компоненты тандемных зондов для детекции ДНК [70] или олигохромофоры для детекции различных биомолекул [71,72]. Было показано, что замена азотистого основания на остаток пирена приводит к дестабилизации дуплексов зондов с комплементарной ДНК-мишенью [73]. Однако, в случае если в дуплексе с ДНК-мишенью пирен расположен напротив апурин/апиридинового сайта, происходит дополнительная стабилизация таких дуплексов [74].

Позже Wengel и соавторы [75,76] предложили LNA и α -L-LNA производные, в которых азотистое основание заменили на остаток пирена. Методы синтеза этих производных похожи,

ключевым синтетическим этапом является стереоселективная реакция Гриньяра с циклическим альдегидом с последующей циклизацией углеводного остатка в условиях реакции Мицунобу, то есть в присутствии *N,N,N',N'*-тетраметилазодикарбоксамид и трибутилфосфина. Ниже продемонстрирована общая схема синтеза *C*-гликозидного конформационно блокированного производного (LNA), в котором пирен является аналогом азотистого основания (Схема 1.6) [75].

Схема 1.6

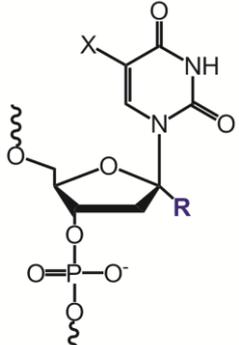
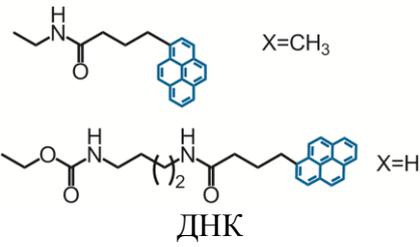
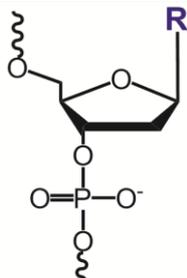
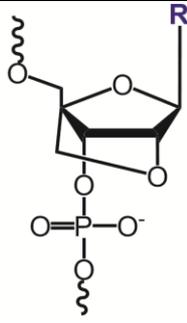
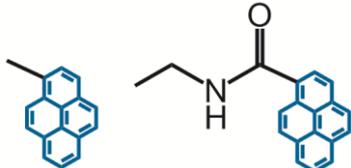
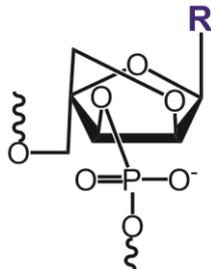


(i) 80% AcOH; (ii) 1) 1-пирен MgBr, THF; 2) *N,N,N',N'*-тетраметилазодикарбоксамид, (*n*-C₄H₉)₃P, бензол; (iii) 1) 2,3-дихлор-5,6-дицианохинон, CH₂Cl₂, H₂O; 2) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; 3) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамид, диизопропилэтиламин, CH₂Cl₂, 25 °C [75].

Спектры флуоресценции дуплексов олигонуклеотидов, полученных с использованием подобного α -L-LNA синтона, с ДНК-мишенью свидетельствуют об интеркаляции остатков пирена внутрь ДНК-дуплексов [76]. Интересно, что, независимо от структуры углеводного остатка, сохраняется тенденция к дестабилизации дуплексов с ДНК-мишенями, как и в случае с зондами, предложенными Коол и соавторами (см. выше).

В таблице 1.3 сведены характеристики описанных выше олигонуклеотидных зондов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 1'-положению рибозы или в качестве аналога азотистого основания.

Таблица 1.3. Структуры конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 1'-положению рибозы или в качестве аналога азотистого основания

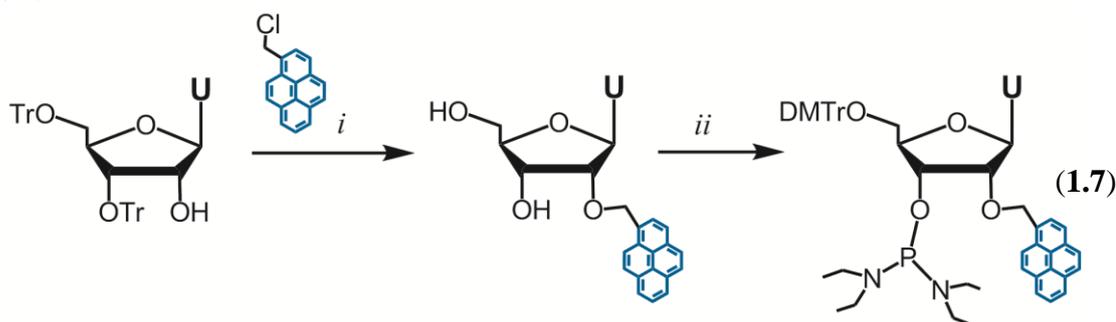
Фрагмент структуры конъюгата	Структура R, тип олигонуклеотида	Положение пирена в НК-дуплексе	Ссылка
	 <p>X=CH₃</p> <p>X=H</p> <p>ДНК</p>	<p>Малая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[67]</p> <p>[66]</p>
	 <p>ДНК, ДНК-подобный олигохромофор</p>	<p>Интеркаляция внутри НК-дуплекса</p>	<p>[68,70,72, 77–80]</p>
	 <p>ДНК, 2'-O-метил РНК, ДНК-подобный олигохромофор</p>	<p>Интеркаляция внутри НК-дуплекса</p>	<p>[75]</p>
	 <p>ДНК</p>	<p>Интеркаляция внутри НК-дуплекса</p>	<p>[76]</p>

1.2.2.2. Модификация по 2'-положению рибозы

Введение пирена по 2'-положению рибозы является самой популярной из встречающихся модификаций, описанных в литературе. Предложено большое число синтетических стратегий для получения конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих остатки пирена в 2'-положении рибозы и её аналогов (см. Табл. 1.4). Популярность такой модификации в первую очередь обусловлена доступностью исходных соединений для синтеза и относительной простотой соответствующих синтетических подходов. Стоит отметить, что введение пирена по 2'-положению рибозы позволяет контролируемо направлять остаток пирена в структуре НК-дуплекса, как правило, в малую бороздку или внутрь дуплекса. Благодаря этому на основе различных 2'-пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов было разработано большое разнообразие методов флуоресцентной детекции РНК и дцДНК, а также дискриминации точечных мутаций ДНК (см., например, обзор [8]).

При синтезе 2'-конъюгатов олигонуклеотидов наиболее часто используется пресинтетический подход. Подход к синтезу первого реагента для автоматического твердофазного синтеза 2'-пиренильных производных олигонуклеотидов, а именно 5'-*O*-диметокситритил-2'-*O*-(1-пиренилметил)-уридин-3'-*N,N*-бис(диэтиламино)фосфитамида (**1.7**), был опубликован еще в 1991 году группой японских исследователей [81] (Схема 1.7). Позже теми же авторами был предложен метод синтеза аналогичных 3'-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамидов на основе уридина, аденозина и цитидина, которые и использовали для синтеза олигонуклеотидов (дезоксирибо-, рибо-, 2'-*O*-метилрибо-) в большинстве работ (см., например, [12,82–87]).

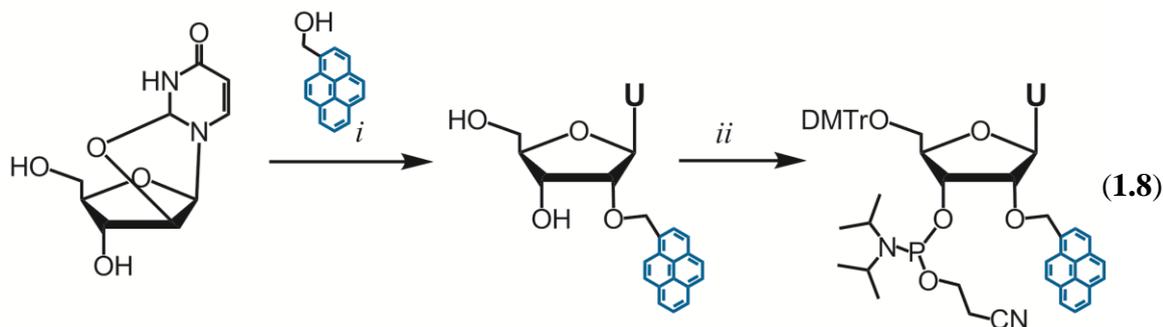
Схема 1.7



(i) 1) KOH, бензол, диоксан; 2) 80% CH₃COOH; (ii) 1) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; 2) бисдиэтиламинохлорфосфитамид, диизопропилэтиламин, CH₂Cl₂, 25 °C [81].

Недавно был описан альтернативный короткий и эффективный метод синтеза фосфитамидного синтона (**1.8**), содержащего остаток пирена, введённый в 2'-положение рибозы через оксиметиленовый линкер, исходя из 2,2'-ангидроуридина [88] (Схема 1.8).

Схема 1.8



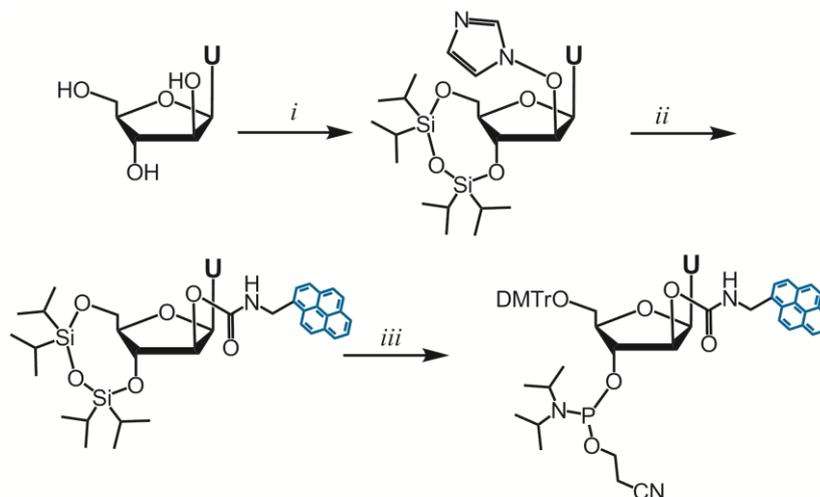
(i) Пирен-1-метильный спирт, $\text{NH}_3 \cdot \text{THF}$, DMSO , 160°C , 3 ч; (ii) 1) 4,4'-диметокситритил хлорид, пиридин, 50°C ; 2) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH_2Cl_2 , 25°C [88].

Свойства олигонуклеотидов, содержащих в цепи нуклеотиды с 2'-*O*-(1-пиренилметильным) остатком, были тщательно изучены. Было показано, что введение одного 2'-*O*-(1-пиренилметил)уридина в олигодезоксирибонуклеотиды приводит к стабилизации их дуплексов с ДНК-мишенью (ΔT_m от +2 до +13 $^\circ\text{C}$), при этом регистрируется флуоресцентный сигнал эксиплекса пирена с азотистым основанием (широкая полоса с максимумом при 450 нм), в то время как стабильность их дуплексов с РНК заметно снижена (ΔT_m от -1 до -10 $^\circ\text{C}$) при сильном увеличении интенсивности флуоресценции пирена (в присутствии нуклеозида dC с 3'-стороны до 250 раз при 378 нм) [86]. В случае же олигорибонуклеотидов введение одного 2'-*O*-(1-пиренилметил)уридина приводило к незначительному увеличению стабильности дуплексов с ДНК с тушением флуоресценции пирена, а также умеренной дестабилизации дуплексов с РНК при многократном увеличении флуоресценции пирена [12]. С помощью ЯМР-спектроскопии в режиме 2D NOESY было показано, что в РНК-РНК-дуплексе остаток пирена экспонирован из дуплекса и находится в малой бороздке, а в ДНК-ДНК-дуплексе, напротив, интеркалирует внутрь и взаимодействует с азотистыми основаниями [12]. Кроме того, было показано, что для олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих две вставки 2'-*O*-(1-пиренилметил)уридина подряд и нуклеозид 2'-*O*-метил-С с 3'-стороны, характерна высокая чувствительность пиренильной эксимерной флуоресценции к образованию дуплексов с комплементарной РНК [83,89]. Благодаря этим уникальным свойствам олигонуклеотиды, содержащие 2'-*O*-(1-пиренилметильные) остатки, были использованы в ряде флуоресцентных методов детекции РНК [83,86,89,90], а также в качестве интеркаляторов, эффективно стабилизирующих дуплексы ДНК-ДНК [91–93].

Коршун и соавторы предложили простой и эффективный метод введения пиренильного остатка в 2'-положение уридина [94–97] или арабино-уридина [98,99] через образование 2'-карбаматов, устойчивых в условиях синтеза и деблокирования олигонуклеотидов. На схеме 1.9

в качестве примера представлена схема синтеза фосфитамида 2'-модифицированного *арабино*-уридина, описанная в работе [98].

Схема 1.9



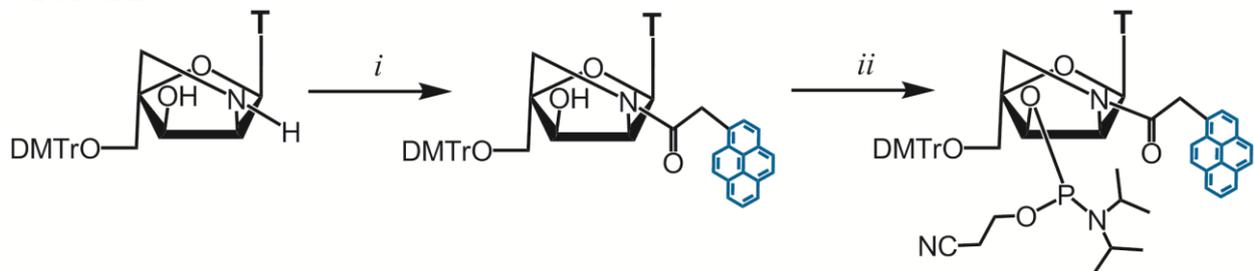
(i) 1) $O(Si(iPr)_2Cl)_2$, пиридин; 2) 1,1'-карбонилдиимдазол, CH_2Cl_2 ; (ii) 1) 1-пиренилметиламин, CH_3CN , THF; 2) *n*-бутиламин, CH_3CN , THF; (iii) 1) $Et_3N \cdot 3HF$, THF; 2) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; 3) 2-цианэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамида, тетразолид диизопропиламина, CH_2Cl_2 , 25 °C [98].

С использованием синтезированных авторами новых пиренсодержащих фосфитамидов на основе 2'-карбаматов уридина [94–97] или *арабино*-уридина [98,99] были получены серии олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие от одного до трех 2'-пирен-меченых звеньев (структуры модифицированных фрагментов показаны в Таблице 1.4). Как правило, введение этих модификаций оказывает дестабилизирующий эффект на дуплексы зондов с ДНК-мишенью; видимо, стабилизирующий эффект пирена не компенсирует дестабилизирующий эффект 2'-карбаматной группы. Интенсивность флуоресценции олигонуклеотидов, содержащих 2'-(пирен-1-метилкарбамат)-модифицированные производные уридина, возрастала при гибридизации зондов с РНК-мишенью (от 6 до 30 раз). Из серии олигонуклеотидов, содержащих вставки 2'-пирен-карбаматов *арабино*-уридина, были отобраны чувствительные зонды, способные образовывать межцепочечный эксимер, то есть т.н. «зиппер»-зонды [98,99].

Весьма удачной оказалась идея получения *N*2'-пиренильных производных 2'-амино-LNA и 2'-амино- α -LNA, реализованная в большом количестве работ Wengel, Hrdlicka и соавторов (см., например, [88,100–105]) (см. Таблицу 1.4). Это связано с тем, что конфигурация углеводных остатков LNA и α -LNA нуклеотидов такая же, как у остатков рибозы и дезоксирибозы в РНК и ДНК нуклеотидах, соответственно, что позволяет имитировать природные нуклеотиды. Кроме того, эти производные конформационно блокированы, в результате чего они обладают гораздо меньшей конформационной подвижностью и упорядочивают соседние нуклеотиды цепи, что приводит к сильному увеличению термической стабильности дуплексов с НК-мишенями [8].

Однако, синтез фосфитамидных синтонов таких производных весьма длительный, трудоемкий и включает примерно 20 стадий (финальный выход соединений ~3%) [102]. На схеме 1.10 в качестве примера представлены лишь финальные стадии синтеза 2'-*N*-(пирен-1-ил)ацетил-2'-амино- α -LNA синтона [106].

Схема 1.10

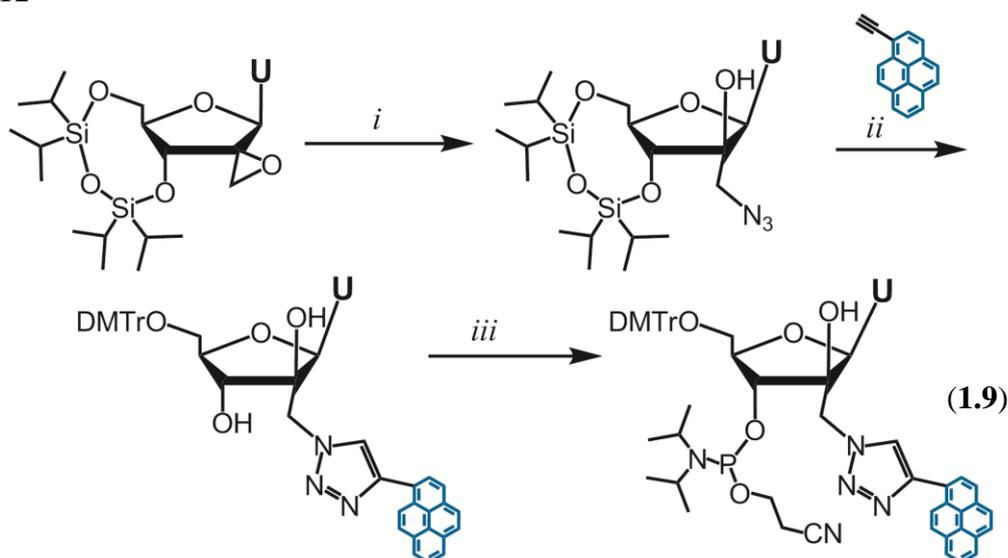


(i) 1-Пиренуксусная кислота, гидрохлорид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, CH_2Cl_2 , 25 °C; (ii) 1) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; 2) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH_2Cl_2 , 25 °C [106].

Было показано, что введение остатка пирена в состав 2'-амино-LNA и 2'-амино- α -LNA через короткие жесткие линкеры, как правило, приводит к наследованию эффектов исходных LNA и α -LNA нуклеотидов на термостабильность НК-дуплексов по сравнению с немодифицированными НК-дуплексами (см., например, [88,100–105]). Флуоресцентные свойства этих 2'-модифицированных олигонуклеотидов сильно различаются в зависимости от длины линкера и типа введенного пиренильного производного. Например, описаны высокочувствительные зонды на основе олигонуклеотидов различной природы (дезоксирibo-, рибо-, 2'-*O*-метилрибо-), содержащие от одного до четырех пиреновых остатков, введенных в состав 2'-амино-LNA, для детекции РНК. В дуплексе с НК-мишенью пирен жестко закреплен в малой бороздке дуплекса и поэтому происходит сильное увеличение интенсивности флуоресценции [103]. Наоборот, введение пиренильного остатка в составе 2'-амино- α -LNA нуклеотида в олигодезоксирибонуклеотид, по всей видимости, приводит к интеркаляции пирена в совершенные дуплексы зонда с РНК и ДНК, и тушению флуоресценции пирена [106].

Недавно была опубликована простая и эффективная синтетическая стратегия (Схема 1.11), позволяющая получить фосфитамида (**1.9**) для введения 2'-*C*-(пирен-1-илтриазол)-производного *арабино*-уридина в олигонуклеотид в ходе твердофазного синтеза [107]. Метод позволяет всего за восемь стадий исходя из уридина получить фосфитамида (**1.9**) с суммарным выходом ~20%.

Схема 1.11



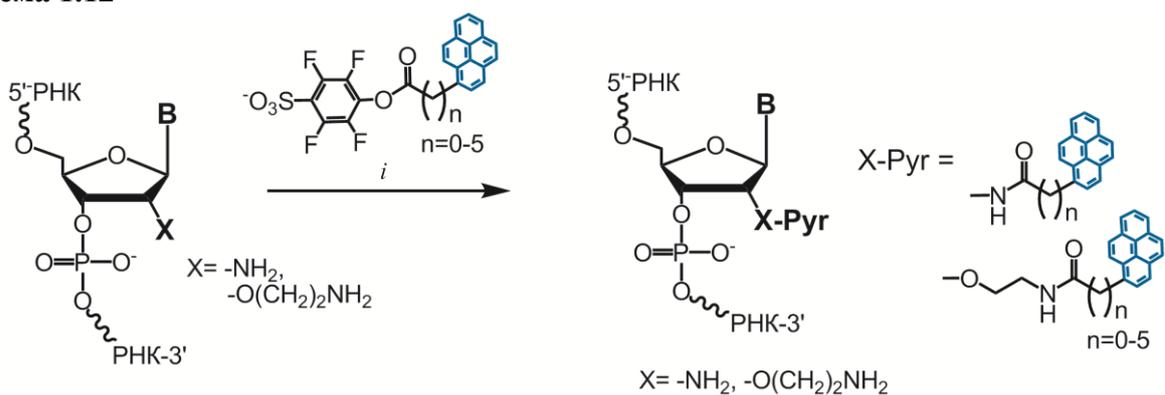
(i) NaN_3 , DMF; (ii) 1) TBAF, THF; 2) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; 3) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, аскорбат Na, THF/ $\text{H}_2\text{O}/m\text{pem}-(\text{C}_4\text{H}_9)\text{OH}$ /пиридин; (iii) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH_2Cl_2 , 25 °C [107].

Олигонуклеотиды, содержащие 2'-*C*-(пирен-1-илтриазол)-производные *арабино*-уридина, как правило, образовывали гораздо более стабильные дуплексы с РНК- и ДНК-мишенями, по сравнению с немодифицированными дуплексами.

Флуоресцентные спектры описанных 2'-пиренильных олигонуклеотидов содержали две характерные полосы с максимумами при 386 нм и 405 нм (при возбуждении флуоресценции пирена при 350 нм). При гибридизации этих олигонуклеотидов с комплементарной РНК-мишенью происходило значительное увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала, чего не происходило при гибридизации с комплементарной ДНК. Свойства олигонуклеотидов, содержащих вставки 2'-*C*-(пирен-1-илтриазол)-производных *арабино*-уридина, были исследованы с целью отбора чувствительных эксимер-образующих «зиппер»-зондов [107].

Постсинтетический подход для введения модификации в 2'-положения рибозы встречается в литературе гораздо реже. Одним из примеров синтеза 2'-модифицированных конъюгатов с использованием постсинтетического подхода может служить метод, описанный в работе [108]. Данный метод основан на взаимодействии олигорибонуклеотида, содержащего одну 2'-аминогруппу, с *n*-сульфотетрафторфениловым эфиром 1-пиренкарбоновой кислоты (Схема 1.12).

Схема 1.12



(i) 0.1 M фосфат Na, pH 8.0, 0.2 mM EDTA, 50% DMF, 25 °C, 20 мин [108].

Была продемонстрирована применимость полученных 2'-пиренильных производных олигорибонуклеотидов для флуоресцентного зондирования вторичной структуры РНК на примере 160-звенного РНК-транскрипта [108].

В таблице 1.4 сведены характеристики описанных выше и некоторых других олигонуклеотидных зондов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 2'-положению рибозы.

Таблица 1.4. Структуры конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 2'-положению рибозы

Фрагмент структуры конъюгата	Структура R, тип олигонуклеотида	Положение пирена в НК-дуплексе, особенности	Ссылка
	<p style="text-align: center;"> $m=0, n=1$ $m=1, n=1$ $m=4, n=3$ $m=6, n=3$ </p> <p style="text-align: center;">ДНК/ со вставками LNA, 2'-F-, 2'-O-метил РНК, РНК, 2'-O-метил РНК</p>	Малая бороздка НК-дуплекса или интеркаляция внутрь НК-дуплекса	[82–84,86,87,89,90,92,93,105,109–115] [95] [94] [116] [108] [22] [117] [118]

	<p> $X=CH_3$ $X=H, CH_3$ $X=H$ $n=0-5$ $X=CH_3$ $n=0,1,3$ </p> <p>ДНК, РНК</p>	<p>Интеркаляция внутри НК- дуплекса или малая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[88] [119] [120] [92] [121] [122] [108]</p>
	<p>ДНК</p>	<p>Интеркаляция внутри НК- дуплекса</p>	<p>[120]</p>
	<p>ДНК</p>	<p>Большая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[98] [99]</p>
	<p>ДНК/ со вставками LNA, 2'-O-метил РНК/ со вставками LNA</p>	<p>Малая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[103,104] [123][124] [125] [27]</p>

	<p>ДНК</p>	<p>Интеркаляция внутри дуплекса</p>	<p>[88][102] [125][126]</p>
	<p>ДНК</p>	<p>Бороздки НК- дуплекса</p>	<p>[127]</p>
	<p>ДНК</p>	<p>Интеркаляция внутри дуплекса</p>	<p>[128] [107]</p>

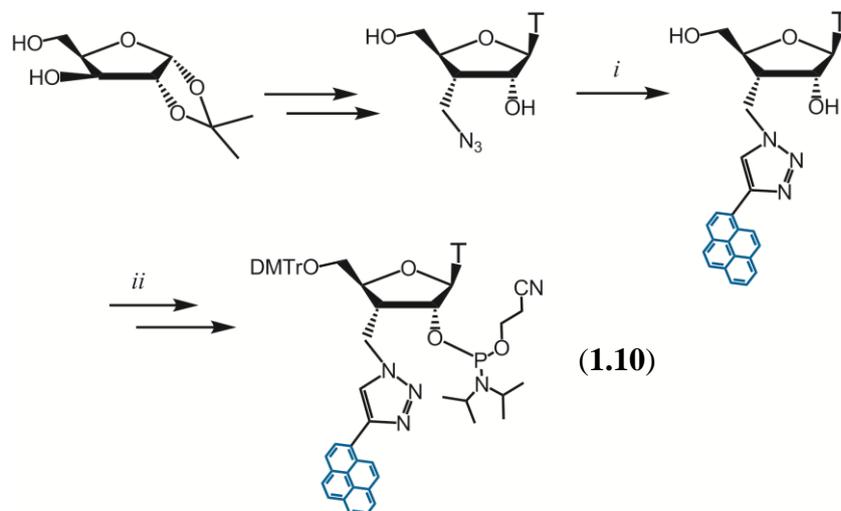
1.2.2.3. Модификация по 3'- или 4'-положению рибозы

Наиболее часто синтез конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих терминальные 3'-пирен-меченые звенья, ведут в рамках постсинтетического подхода [129–131]. Эти методы, как правило, предполагают введение амиолинкера или фосфата на 3'-конец олигонуклеотида в процессе твердофазного синтеза с использованием премодифицированных полимерных носителей. После завершения синтеза и деблокирования 3'-модифицированного олигонуклеотида пиренильную метку вводят с помощью взаимодействия активированного эфира 1-пиренкарбоновой кислоты с амиолинкером олигомера [132] или амиопроизводного пирена с активированным фосфатом олигомера [130,131].

Было описано несколько пресинтетических методов получения олигонуклеотидов с остатком пирена, введенным по 3'-положению рибозы нетерминального нуклеотида. В этих случаях модифицированные звенья вводят в олигонуклеотидную цепь посредством 2'-5'-фосфодиэфирных связей. Один из таких методов был описан в работе [133]. Ключевой стадией

синтеза является Cu(I)-катализируемое формирование 1,4-триазола, исходя из 1-этинилпирена и 3'-азидопроизводного 2'-риботимидина, при микроволновом облучении (Схема 1.13).

Схема 1.13



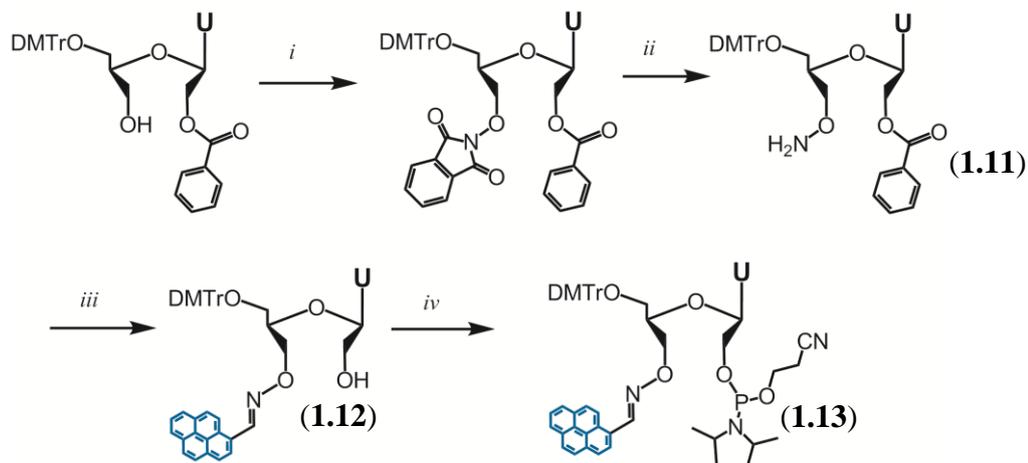
(i) 1-Этинилпирен, CuSO_4 , аскорбиновая кислота, DMF/ H_2O (19:1), 15 мин, 125 °С, микроволновое излучение; (ii) 1) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °С; 2) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH_2Cl_2 , 25 °С [133].

С использованием полученного фосфитамида (**1.10**) была синтезирована серия пирен-модифицированных 14-звенных пиримидин-богатых олигонуклеотидов, содержащих от одной до трех вставок 3'-пирен-меченых 2'-риботимидинов. Было показано, что эти олигонуклеотиды образуют Хугстенковские триплексы с дцДНК-мишенью с увеличением интенсивности флуоресценции пирена. Авторам удалось увеличить термостабильность и квантовый выход триплекса введением пяти стабилизирующих α -L-LNA нуклеотидов в зонд, содержащий один 3'-пирен-меченый 2'-риботимидин. Было продемонстрировано способность этого флуоресцентного зонда распознавать мисматчи в дцДНК [133].

Недавно Wengel и соавторы предложили подход к синтезу пирен-модифицированных 3'-*O*-амино-UNA (Unlocked Nucleic Acid) [134]. Ключевым интермедиатом в предложенной синтетической стратегии является 2'-5'-защищенный 3'-*O*-амино-UNA нуклеозид (**1.11**), который впоследствии вводят в реакцию с 1-пиренкарбоксальдегидом (Схема 1.14). Полученный оксим (**1.12**) далее превращают в фосфитамида (**1.13**) и используют для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, содержащих от одной до трех вставок 3'-пирен-меченых уридинов. Синтезированные 21-звенные олигонуклеотиды (дезоксирибо- или 2'-*O*-метилрибо-) образовывали более стабильные дуплексы с ДНК-мишенью и демонстрировали способность распознавать мисматчи в РНК- и ДНК-мишенях. Введение 3'-пирен-модифицированных 3'-*O*-амино-UNA уридинов в триплекс-формирующие 16-звенные пиримидин-богатые олигодезоксирибонуклеотиды оказывало положительный эффект на

термодинамическую стабильность образующихся триплексов зондов с дцДНК. Этот эффект усиливался при введении LNA нуклеотида в олигомер [134].

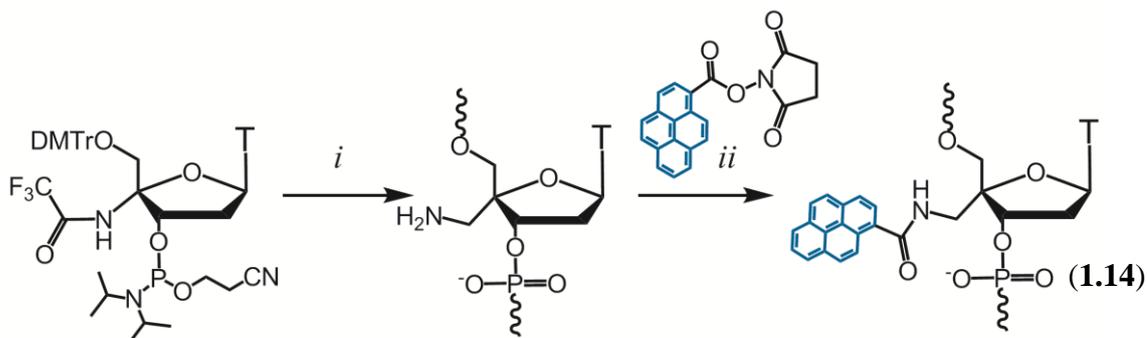
Схема 1.14



(i) *N*-гидроксифталимид, PPh_3 , диизопропилазобоксидат, THF, 25 °C, 2 ч; (ii) гидразин моногидрат, THF, EtOH, 16 ч; (iii) 1-пиренкарбоксальдегид, CH_3OH , 16 ч; (iv) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH_2Cl_2 , 25 °C [134].

4'-Положение рибозы достаточно редко подвергается модификации. В настоящее время опубликовано лишь две работы, посвященные синтезу 4'-пирен-меченых олигонуклеотидов [44,135]. Ниже представлена схема синтеза 4'-пиренкарбоксамид-модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов (**1.14**), осуществленная в рамках постсинтетического подхода (Схема 1.15) [44].

Схема 1.15

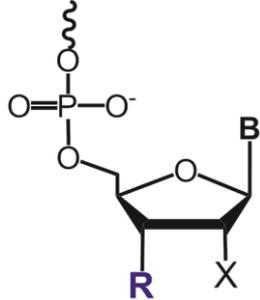
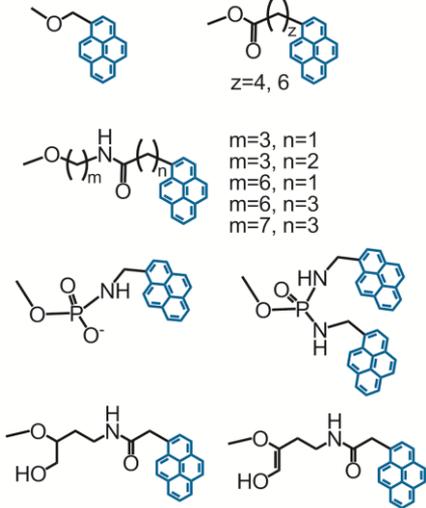
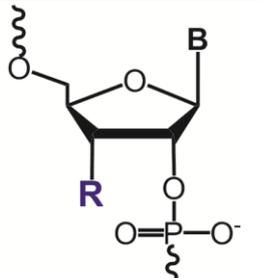
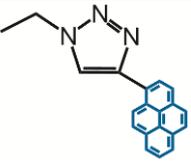
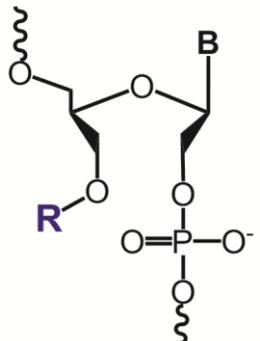
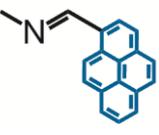


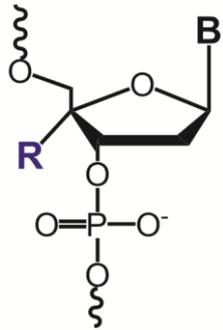
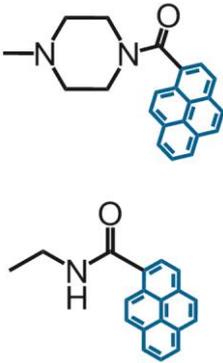
(i) 1) Автоматический фосфитамидажный синтез олигонуклеотида; 2) NH_4OH , 55 °C; (ii) *N*-оксисукцинимидный эфир пирен-1-овой кислоты, DMF, 0.1 М фосфат Na, pH 8.5, 37 °C [44].

При гибридизации олигонуклеотидов (**1.14**) с комплементарной ДНК пиренильный остаток, вероятно, ориентирован в малую бороздку дуплекса, что приводит к значительному увеличению интенсивности флуоресцентного сигнала пирена. Однако, в случае ДНК-мишени, содержащей мисматч, пирен интеркалирует внутрь дуплекса и происходит тушение флуоресценции пирена [44].

В таблице 1.5 сведены характеристики описанных выше и некоторых других олигонуклеотидных зондов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 3'- или 4'-положению рибозы.

Таблица 1.5. Структуры конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 3'- или 4'-положению рибозы

Фрагмент структуры конъюгата	Структура R, тип олигонуклеотида	Положение пирена в НК-дуплексе, особенности	Ссылка
 <p>X=H, CH₃O</p>	 <p>z=4, 6</p> <p>m=3, n=1 m=3, n=2 m=6, n=1 m=6, n=3 m=7, n=3</p> <p>ДНК, 2'-O-метил РНК</p>	<p>Малая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[136,137] [19]</p> <p>[118,132,138,139]</p> <p>[131]</p> <p>[140] [141] [142]</p>
	 <p>ДНК/ со вставками α-L-LNA</p>	<p>Малая бороздка НК-дуплекса или интеркаляции внутрь дуплекса</p>	<p>[133]</p>
	 <p>ДНК, 2'-O-метил РНК</p>	<p>Малая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[134]</p>

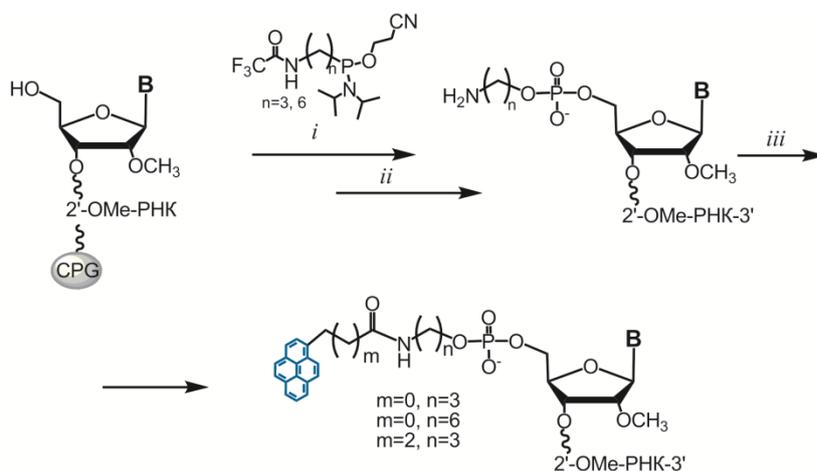
	 <p>ДНК</p>	<p>Малая бороздка НК-дуплекса или интеркаляция внутрь дуплекса</p>	<p>[135]</p> <p>[44]</p>
---	--	--	--------------------------

1.2.2.4. Модификация по 5'-положению рибозы

Большое число работ посвящено синтезу и исследованию свойств 5'-пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов. Наиболее часто, согласно литературным данным, используют постсинтетическую модификацию в растворе или на твёрдой фазе.

Один из распространённых методов постсинтетической модификации олигонуклеотидов заключается во введении аминлинкера на 5'-конец олигомера. При введении аминлинкера в 5'-положение рибозы используют соответствующий ненуклеотидный фосфитаמיד на заключительной стадии синтеза. После завершения синтеза и деблокирования такого 5'-аминомодифицированного олигонуклеотида пиренильную метку вводят с помощью реакции с активированным эфиром пиренкарбоновой кислоты (см., например, [129]) (Схема 1.16).

Схема 1.16



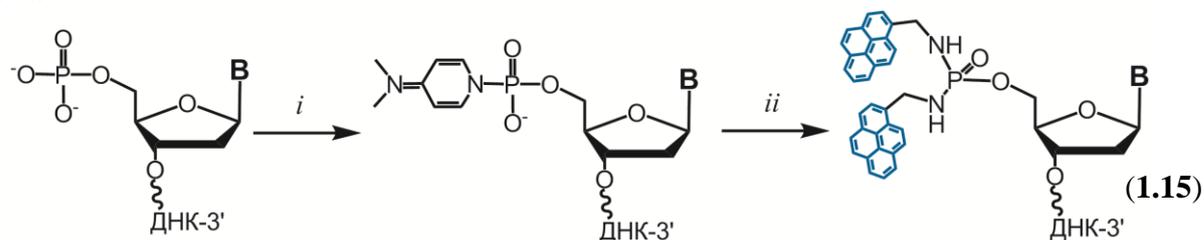
(i) Финальный цикл автоматического фосфитаמידного синтеза; (ii) NH_4OH , 55 °С; (iii) *N*-оксисукцинимидный эфир 1-пиренкарбоновой кислоты, 0.1 М Na_2CO_3 , рН 8.5, DMSO, 25 °С, 5 ч [129].

Введение нескольких остатков пирена в олигонуклеотид позволяет повысить чувствительность зондов и расширяет область их применения за счет возможности образования эксимеров. В работах [143–148] описан синтез реагентов, используемых для введения двух

пиренильных остатков на 5'-конец олигонуклеотида на последней стадии стандартного фосфитамидного синтеза (Табл. 1.6).

Один из примеров введения двух пиренильных остатков на 5'-конец олигодезоксирибонуклеотидов с использованием постсинтетического подхода описан в работе [18]. В рамках предложенного метода два пиренильных остатка вводили в олигонуклеотид через 5'-фосфат, для этого проводили селективную активацию фосфата незащищенного олигонуклеотида трифенилфосфином и дипиридилдисульфидом в присутствии диметиламинопиридина, с последующим взаимодействием с пиренилметиламином (Схема 1.17).

Схема 1.17

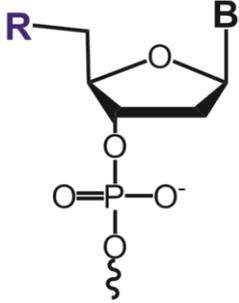
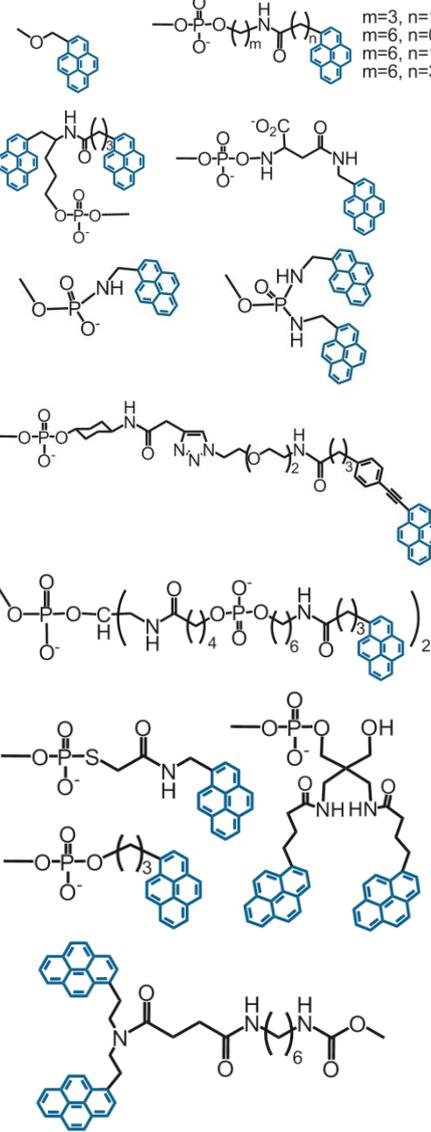


(i) PPh_3 , $(\text{PyS})_2$, 4,4'-диметил-4-аминопиридин, DMSO; (ii) 1-пиренилметиламин, DMSO [18].

Полученные 5'-биспиренильные зонды (**1.15**) проявляли высокую чувствительность к присутствию комплементарной РНК-мишени в растворе. Характер изменений в спектрах флуоресценции зависел от структуры образующегося дуплекса с РНК-мишенью. Полученные 5'-биспиренильные производные олигодезоксирибонуклеотидов (**1.15**) авторы [18] использовали для флуоресцентного исследования вторичной структуры протяженных РНК.

В таблице 1.6 сведены характеристики описанных выше и некоторых других олигонуклеотидных зондов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 5'-положению рибозы.

Таблица 1.6. Структуры конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих пиренильные остатки, введенные по 5'-положению рибозы

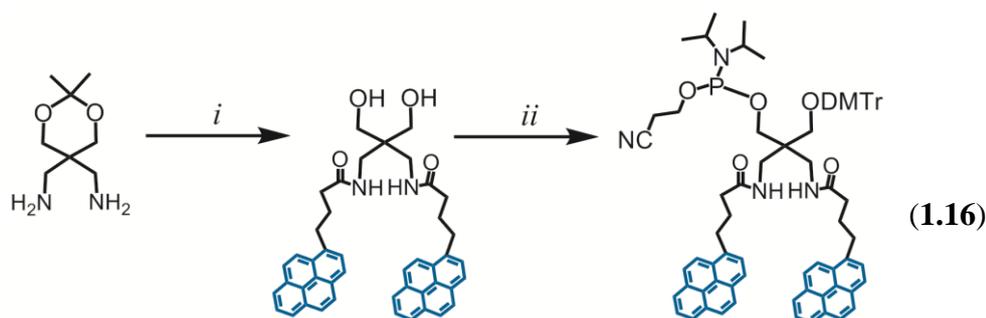
Фрагмент структуры конъюгата	Структура R, тип олигонуклеотида	Положение пирена в НК-дуплексе, особенности	Ссылка
	 <p style="text-align: center;">ДНК, 2'-O-метил РНК</p>	<p>Малая бороздка НК-дуплекса</p>	<p>[136] [132,138,139,149] [148] [130,150,151] [18,152] [131,153-155] [156] [157] [19,158] [143-146] [147]</p>

1.2.3. Введение пирена в виде ненуклеотидных вставок

Введение остатков пирена в олигонуклеотид в виде ненуклеотидной вставки является одной из наиболее распространенных модификаций, как правило, осуществляемых в пресинтетическом варианте. При таком способе введения пирена в сахарофосфатный остов олигонуклеотида остаток пирена имеет тенденцию интеркалировать внутрь НК-комплекса (дуплекса или триплекса), стабилизируя его. Благодаря этому свойству пирена ненуклеотидные вставки часто используют для создания триплекс-формирующих олигонуклеотидов.

В работе [143] был описан подход к синтезу модифицирующего реагента (**1.16**), позволяющего ввести пиреновый бихромофор в олигонуклеотид в составе одной вставки (Схема 1.18). Введение такой вставки в нетерминальное положение олигонуклеотида приводило к существенной дестабилизации дуплексов с ДНК-мишенью (ΔT_m от -12 до -14 °С), при этом в дуплексах с ДНК происходило усиление эксимерной флуоресценции зонда.

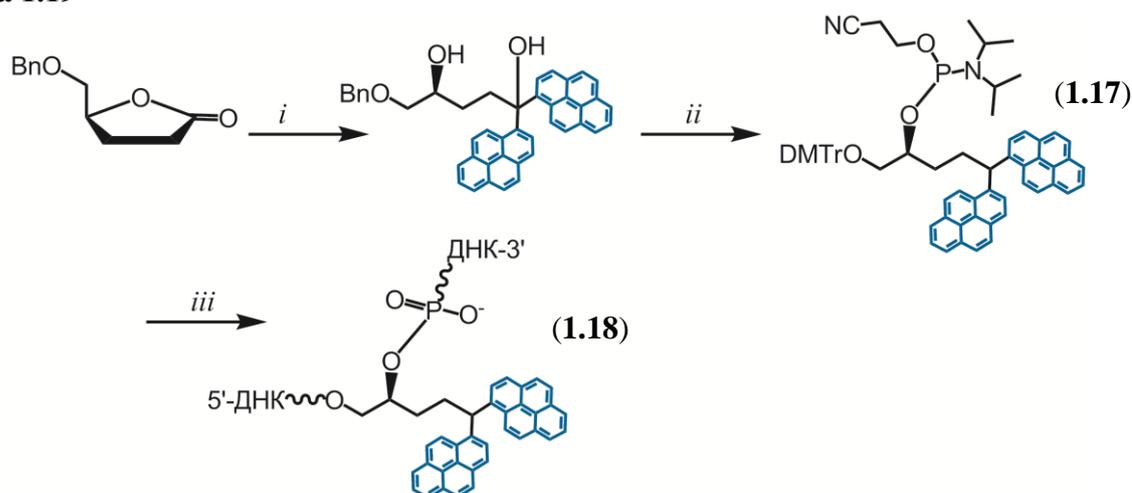
Схема 1.18



(i) 1-Пиренбутановая кислота, *N,N'*-дихлорогексаметилкарбодиимид, 1-гидроксибензотриазол, DMF, 25 °С, 24 ч; (ii) 1) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °С; 2) 2-цианэтил-*N,N'*-диизопропилхлорфосфитамид, диизопропилэтиламин, CH₂Cl₂, 25 °С [143].

Позже авторами работы [159] был опубликован синтез альтернативного реагента (**1.17**), который также позволяет ввести два остатка пирена в виде одной вставки (Схема 1.19). Стабильность дуплексов олигонуклеотидов (**1.18**) с ДНК- и РНК-мишенями была значительно ниже, чем у немодифицированных дуплексов. В спектрах флуоресценции дуплексов олигонуклеотидов (**1.18**) с комплементарной ДНК-мишенью регистрировали интенсивную эксимерную флуоресценцию, а в спектрах самих зондов (**1.18**) и их дуплексов с ДНК, содержащими мисматчи, регистрировали сигнал эксиплекса пирена с азотистым основанием.

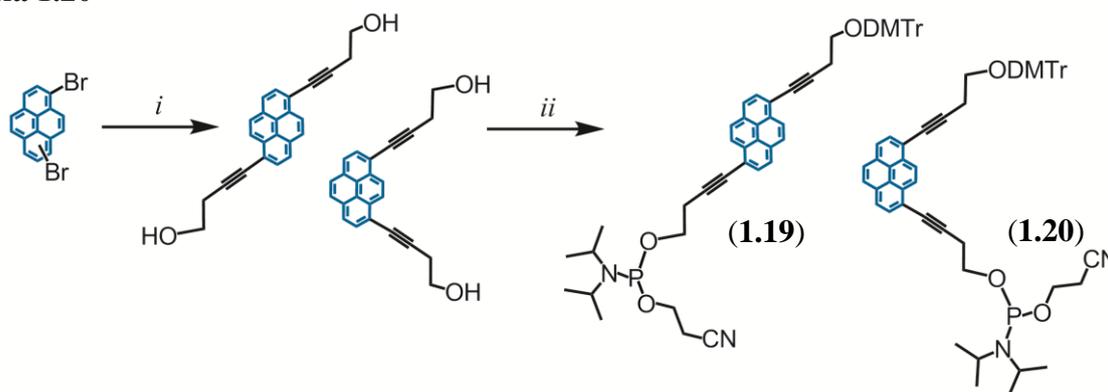
Схема 1.19



(i) 1) 1-Бромпирен, *n*-бутиллитий, THF; 2) BF_3 , Et_2O , Et_3SiH , CH_2Cl_2 ; (ii) 1) H_2 , Pd на древесном угле, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:9); 2) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; 3) 2-цианэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамида, тетразолид диизопропиламина, CH_2Cl_2 , 25 °; (iii) 1) автоматический фосфитамидажный синтез олигонуклеотида; 2) NH_4OH , 55 °C [159].

Häner и соавторы предложили удобный метод получения ненуклеозидных изомерных синтонов (1.19) и (1.20) (Схема 1.20) [160]. В основе предложенного ими подхода лежит палладий-катализируемая реакция смеси 1,6- и 1,8-дибромпирена с 3-бутин-1-олом (реакция Соногаширы).

Схема 1.20

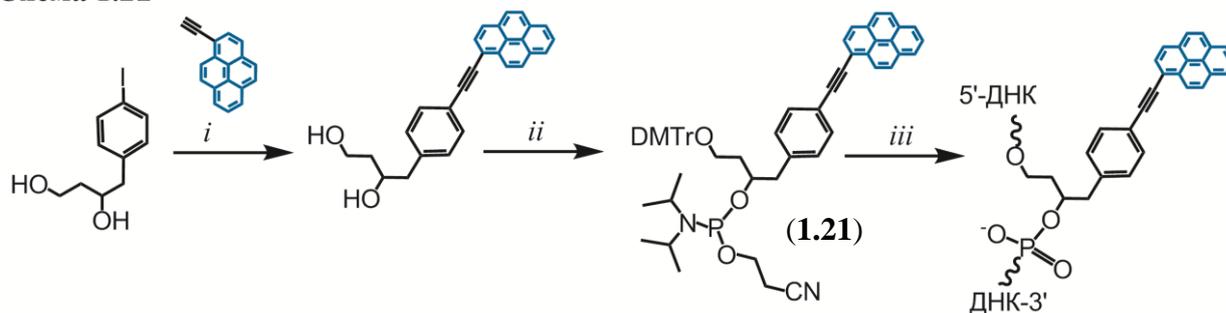


(i) 3-Бутин-1-ол, $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$, CuI , THF, Et_3N ; (ii) 1) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50 °C; 2) 2-цианэтил-*N,N*-диизопропилхлорфосфитамида, диизопропилэтиламин, CH_2Cl_2 , 25 °C [160].

Было показано, что олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие одну или две подряд пиренильные вставки, способны формировать межцепочечный и внутрицепочечный эксимер [160,161].

Коршун и соавторы описали эффективный подход к синтезу реагента (1.21) для введения остатка 1-(фенилэтинил)пирена в состав олигодезоксирибонуклеотида (Схема 1.21) [162].

Схема 1.21

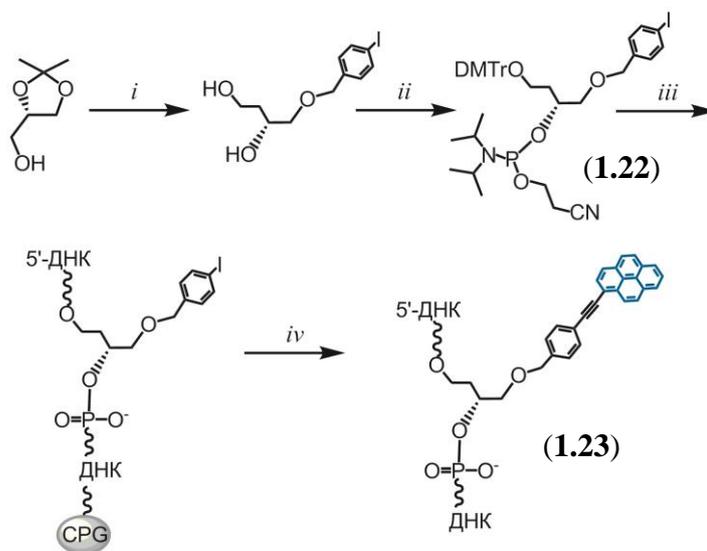


(i) 1-Этинилпирен, $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$, CuI , DMF , Et_3N ; (ii) 1) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50°C ; 2) 2-цианэтил- N,N,N',N' -тетраизопропилфосфитамида, тетразолид диизопропиламина, CH_2Cl_2 , 25°C ; (iii) 1) автоматический фосфитамидажный синтез олигонуклеотида; 2) NH_4OH , 55°C [162].

Было показано, что введение остатка 1-(фенилэтинил)пирена в 3'-терминальное положение олигонуклеотида способствует стабилизации дуплексов зондов с ДНК, в то время как нетерминальная модификация дестабилизировала такие дуплексы. Впервые была продемонстрирована способность остатков 1-(фенилэтинил)пирена, введенных в состав олигонуклеотида, образовывать эксимер [162]. Позже на основе олигонуклеотидов, содержащих два нетерминальных остатка 1-(фенилэтинил)пирена подряд, авторы разработали систему детекции однонуклеотидных замен в гене 23S рНК *H. Pylori*, определяющих устойчивость этой бактерии к кларитромицину [163].

Красивым примером постсинтетического подхода к синтезу олигонуклеотидов, содержащих остаток пирена в составе ненуклеотидной вставки TINA (Twisted Intercalating Nucleic Acids), является метод, описанный в [75] (Схема 1.22).

Схема 1.22

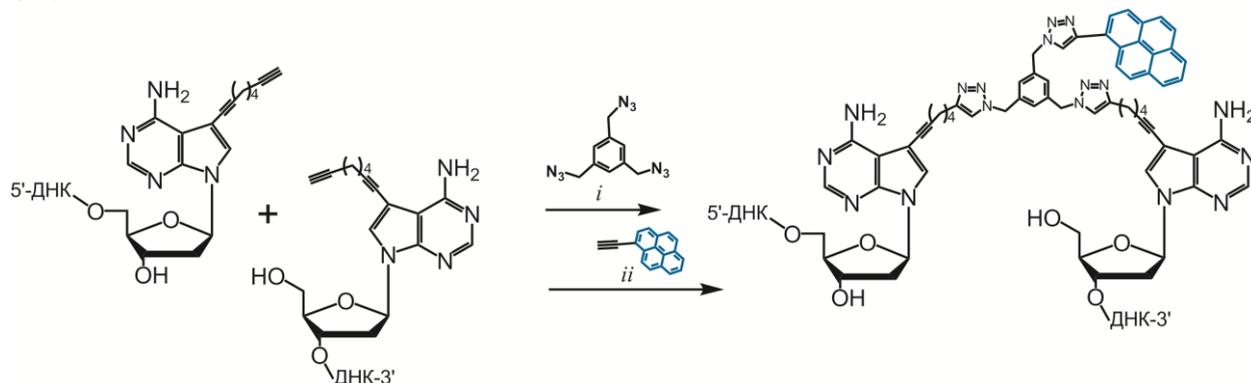


(i) 1) 1-Йодбензилбромид, KOH , толуол; 2) $80\% \text{CF}_3\text{COOH}$, 25°C ; (ii) 1) 4,4'-диметокситритилхлорид, пиридин, 50°C ; 2) 2-цианэтил- N,N,N',N' -тетраизопропилфосфитамида, тетразолид диизопропиламина, CH_2Cl_2 , $0-25^\circ\text{C}$, 16 ч; (iii) автоматический фосфитамидажный синтез; (iv) 1) 1-этинилпирен, $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ или $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, CuI , DMF , Et_3N ; 2) NH_4OH , 55°C [164].

Подход заключается в использовании премодифицированного галоген-содержащего фосфитамида (**1.22**) в процессе автоматического синтеза олигонуклеотидов с последующим присоединением 1-этилпирена на твердой фазе с помощью реакции Соногаширы. Олигонуклеотиды (**1.23**), содержащие одну или две ненуклеотидные вставки TINA, образовывали исключительно стабильные Хугстеневские триплексы с дцДНК-мишенью [164]. Благодаря этому свойству TINA-модифицированные олигонуклеотиды впоследствии получили широкое распространение в качестве различных триплекс-формирующих агентов (см., например, [165–167]).

Стоит отметить еще один недавно опубликованный необычный постсинтетический подход к введению пиренильной ненуклеотидной вставки в олигонуклеотиды [168] (Схема 1.23). Метод заключается в «клик»-лигировании двух олигонуклеотидов, каждый из которых содержит терминальное *C7*-алкин-производное пурина, на ДНК-матрице при помощи Cu(I)-катализируемого 1,4-циклоприсоединения с использованием 1,3,5-трис(азидометил)бензола в качестве сшивающего агента. Введение пиренильной метки осуществляют в рамках аналогичной «клик»-реакции с использованием 1-этилпирена.

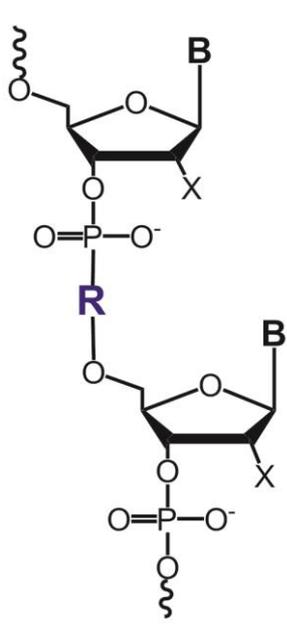
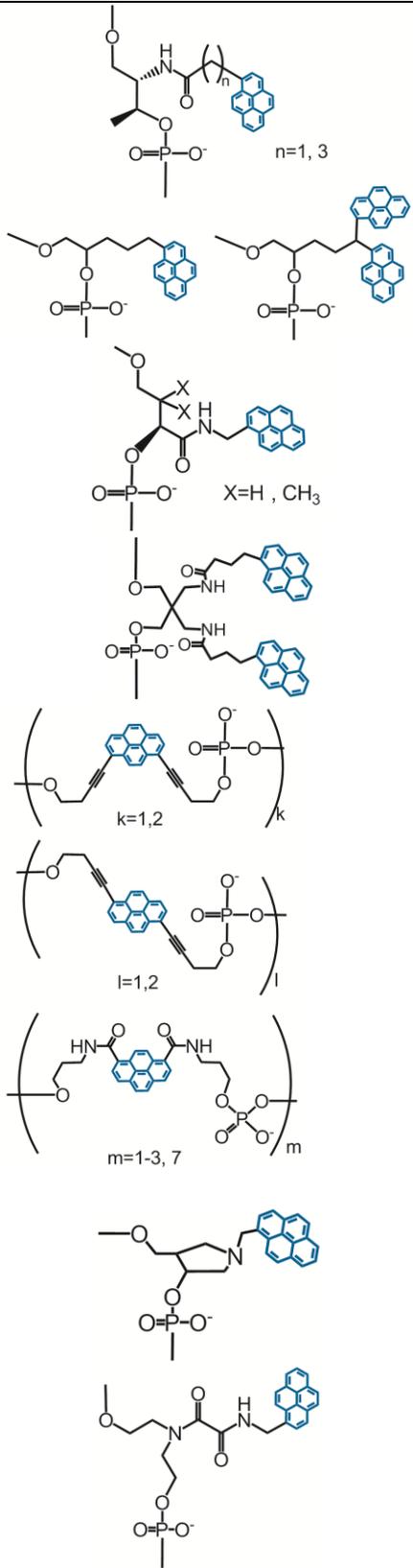
Схема 1.23

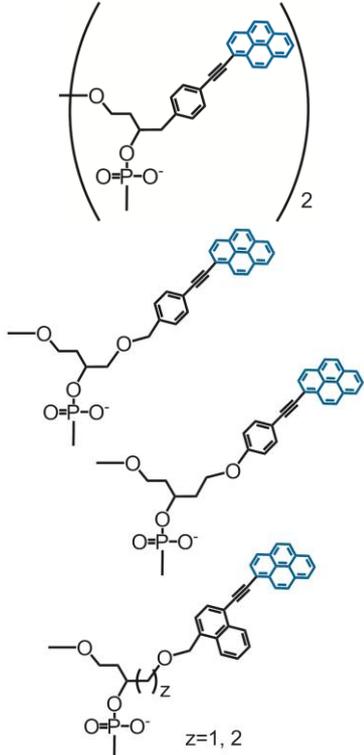
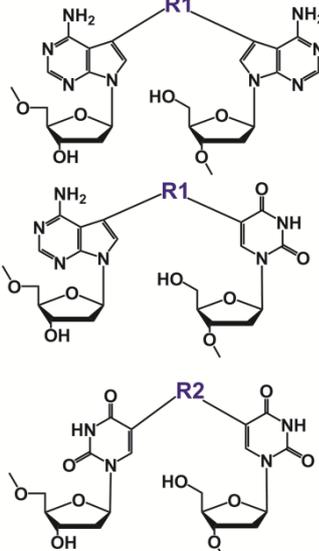
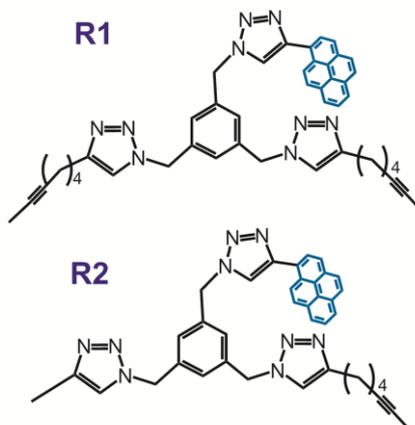
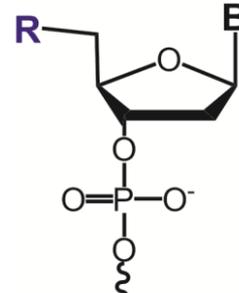
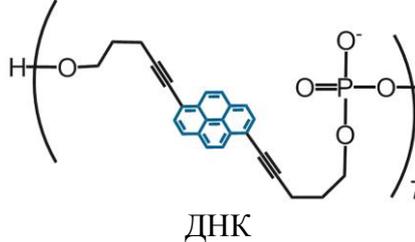


Двойное «клик»-лигирование на ДНК-матрице: (i) 1) комплементарный олигонуклеотид (30 нт), 0.1 М NaCl, 80-20 °С, 2 ч; 2) CuSO₄, трис(бензилтриазилил)амин (ТВТА), трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), 0.2 М NaHCO₃, DMSO/*mpe*m-C₄H₉OH, 1,3,5-трис(азидометил)бензол; (ii) 1-этилпирен, CuSO₄, ТВТА, ТСЕР, 0.2 М NaHCO₃, DMSO/*mpe*m-C₄H₉OH [168].

В таблице 1.7 сведены характеристики описанных выше и некоторых других олигонуклеотидных зондов, содержащих пиренильные остатки, введенные в составе ненуклеотидной вставки.

Таблица 1.7. Структуры конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих ненуклеотидные пиренильные вставки

Фрагмент структуры конъюгата	Структура R, тип олигонуклеотида	Положение пирена в НК-дуплексе, особенности	Ссылка
 <p>X=H, OH</p>		<p>Интеркаляция внутри дуплекса или малая бороздка дуплекса</p>	<p>[169–174] [159] [175] [143] [161] [160] [176–180] [181] [182]</p>

	 <p>ДНК, РНК</p>		<p>[163,183]</p> <p>[133,164–167]</p>
	 <p>ДНК</p>	<p>н/о</p>	<p>[168]</p>
	 <p>ДНК</p>	<p>π-Стэкинг остатков пирена</p>	<p>[184–186]</p>

Представленный арсенал методов синтеза пиренильных производных олигонуклеотидов представляет возможность получения пирен-меченых олигонуклеотидных зондов, содержащих один, два или более остатков пирена, с предсказуемыми свойствами. Перспективам применения этих зондов посвящен следующий раздел данного обзора.

1.3. Перспективы применения пиренильных флуоресцентных зондов

В настоящее время применение пирен-меченых олигонуклеотидов лежит в основе ряда методов флуоресцентной детекции различных взаимодействий с участием нуклеиновых кислот, включая визуализацию РНК и дцДНК в клетках, определение вторичной структуры РНК, обнаружение однонуклеотидных замен в ДНК, детекцию продуктов ПЦР в реальном времени (см., например, обзоры [8,20,187]) и др. Дизайн зондов, а именно, количество, положение и способ введения пиренильных остатков, природа олигонуклеотида, на основе которого создается зонд, его первичная и вторичная структура, наличие «тушителей» флуоресценции, зависит от конкретной задачи. Далее будут рассмотрены основные направления применения пиренильных зондов.

1.3.1. Детекция нуклеиновых кислот

Наиболее часто пиренильные конъюгаты олигонуклеотидов используются для детекции специфических РНК и ДНК последовательностей. Как правило, дизайн таких зондов основан на выборе таких положений олигонуклеотида для мечения пиреном, при которых зонд в отсутствие НК-мишени обладает низким уровнем флуоресценции вследствие её тушения соседними азотистыми основаниями, а при связывании с НК-мишенью происходит увеличение интенсивности флуоресценции благодаря вытеснению пиренильных остатков в бороздку дуплекса (см. Табл. 1.2-1.7). Выбор природы олигонуклеотида в качестве основы зонда также играет важную роль. При создании инструментов селективной детекции РНК оптимальной основой является олигорибонуклеотид или олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид), так как они образуют наиболее стабильные дуплексы с РНК-мишенью (см., например, [83,84,129]). В случае же ДНК-направленных зондов оптимальным вариантом являются олигодезоксирибонуклеотиды или их аналоги со вставками стабилизирующих ДНК-ДНК-дуплексы конформационно блокированных LNA или α -LNA нуклеотидов (см., например, [103,188]).

Особого внимания заслуживают работы Yamana, Murakami и соавторов [12,82–87], в которых они предложили высокочувствительные флуоресцентные зонды для детекции РНК, содержащие остаток пирена, введённый в 2'-положение рибозы через оксиметиленовый линкер (Рис. 1.7). При гибридизации таких 2'-монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 16S рибосомальной РНК происходило сильное увеличение интенсивности мономерной флуоресценции пирена (в присутствии нуклеозида dC с 3'-стороны до 300 раз при 378 нм), но не с ДНК-мишенью [84].

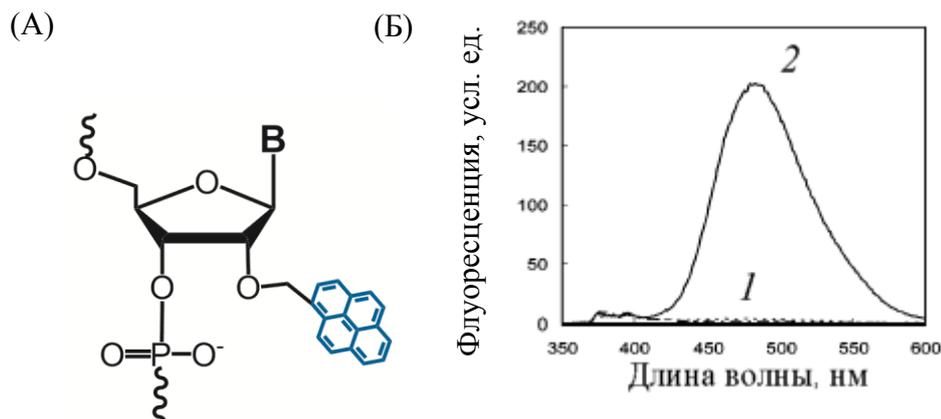


Рис.1.7. (А) Структура 2'-*O*-(1-пиренилметил)-производного нуклеотида (В= U или С); (Б) спектры флуоресценции зонда 5'-m(CGCCUGCUU^{2'Pyr}C^{2'Pyr}ACCACC) (кривая 1) и его дуплекса с комплементарной РНК-мишенью (кривая 2) [110].

Кроме того, при образовании дуплексов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих два 2'-*O*-(1-пиренилметил)уридина подряд и нуклеозид 2'-*O*-метил-цитидин с 3'-стороны, с комплементарной РНК в спектрах флуоресценции регистрировали появление интенсивной эксимерной флуоресценции вследствие взаимодействия двух остатков пирена в малой бороздке дуплекса [83,89,110]. Применимость подобных зондов была продемонстрирована для детекции модельных РНК в растворе [110] и визуализации *c-fos* мРНК в клетках линии С4П [89], а также в качестве компонентов биочипов [111].

Еще одним удачным примером конструкций зондов являются олигодезоксирибонуклеотиды с введенными *N*2'-(пирен-1-ил)карбонильными производными 2'-амино-LNA нуклеотидов (см., например, [188]) (Рис. 1.8). При гибридизации олигонуклеотидов, содержащих от одного до четырех пиренильных остатков, введенных в состав 2'-амино-LNA нуклеотидов, с НК-мишенями происходило значительное увеличение интенсивности мономерной флуоресценции пирена (до 69 раз при непоследовательном введении вставок). В дуплексе с НК-мишенью пирен жестко закреплен в малой бороздке дуплекса и не взаимодействует с азотистыми основаниями, поэтому такие зонды обладают высоким сродством к НК-мишени и квантовым выходом флуоресценции (от 0.30 до 0.99) (Рис. 1.8 В) [188].

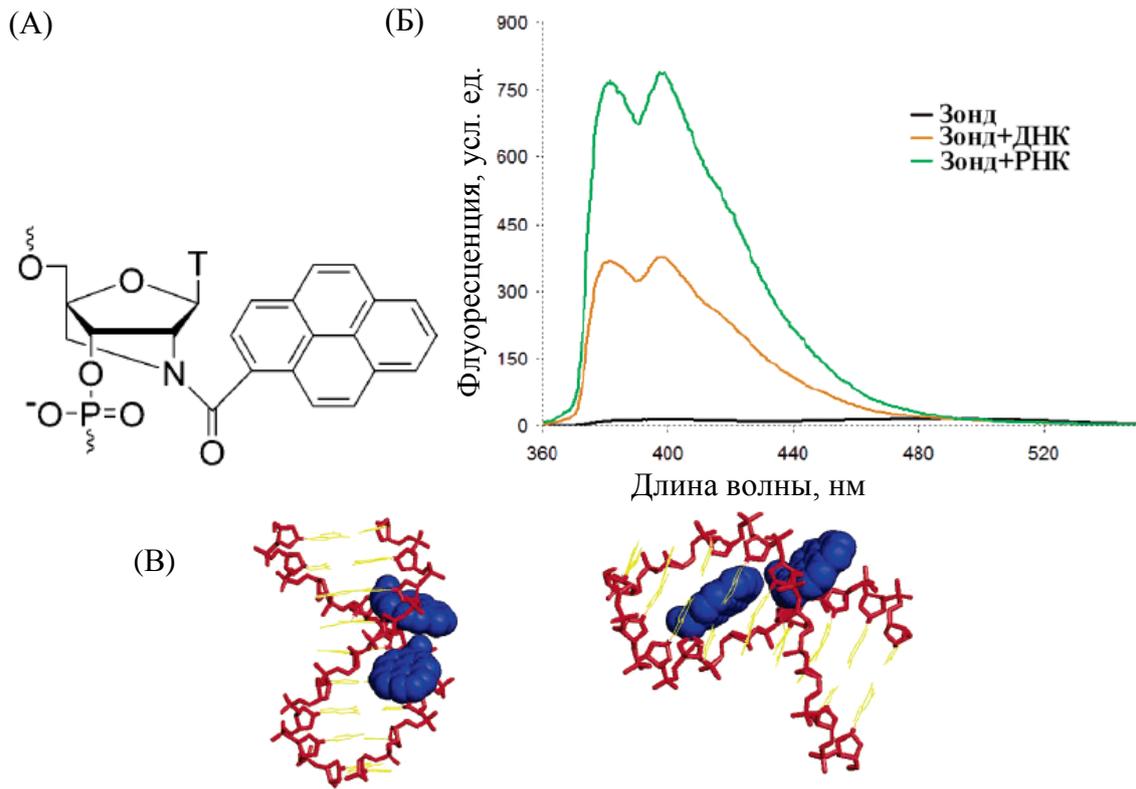


Рис. 1.8. (А) Структура $N2'$ -(пирен-1-ил)карбонильного производного 2'-амино-LNA тимидина (X); (Б) спектры флуоресценции зонда 5'-d(GXG XTX TGC) и его дуплекса с комплементарными НК-мишенями; (В) репрезентативные структуры дуплекса 5'-d(GCA XAX SAC) с ДНК-мишенью, полученные методом молекулярного моделирования [188].

Аналогичные зонды на основе олигорибонуклеотидов и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), а также олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) со вставками LNA нуклеотидов демонстрируют еще большее сродство и высокую чувствительность флуоресценции к НК-мишеням [103]. Эти же авторы предложили интересный дизайн “молекулярных маяков” (структура типа “стебель-петля”), не содержащих тушителя флуоресценции. Зонды представляли собой 29-звенные олигонуклеотиды (дезоксирибо- или 2'-*O*-метилрибо-), модифицированные четырьмя непоследовательно введенными вставками $N2'$ -(пирен-1-ил)карбонильных производных 2'-амино-LNA нуклеотидов в районе петли (Рис. 1.9).

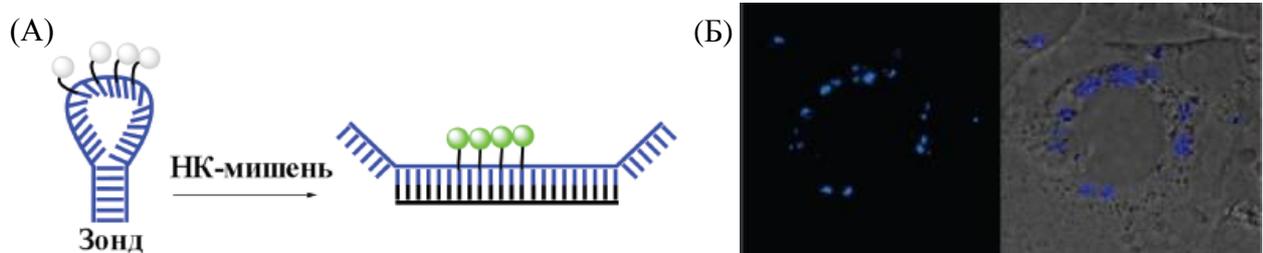


Рис. 1.9. (А) Схематическое представление принципа действия мультипиренильного “молекулярного маяка”, не содержащего тушителя флуоресценции. (Б) Визуализация внутриклеточной Pdx PDC мРНК в клетках линии 3Т3-L1 с использованием мультипиренильных “молекулярных маяков”[103].

Эти мультипиренильные “молекулярные маяки” также обладали чувствительностью флуоресценции к присутствию НК-мишени и высоким квантовым выходом дуплексов (от 0.45 до 0.85). Была продемонстрирована их применимость в качестве зондов для визуализации внутриклеточной мРНК компонента X (Pdhx) пируватдегидрогеназного комплекса (PDC) в клетках линии 3T3-L1 (Рис. 1.9) [103].

Тандемные пиренильные эксимер-образующие зонды на основе олигонуклеотидов, меченных по концевым нуклеотидам, представляют еще один вариант селективных зондов для детекции НК-мишеней. Специфический флуоресцентный сигнал от этих зондов возникает только в случае одновременной гибридизации обеих частей зонда с соседними фрагментами НК-мишени. В работе [189] были описаны тандемные LNA-модифицированные олигонуклеотидные зонды, со вставками *N*2'-(пирен-1-илметил)-2'-амино-LNA нуклеотидов (Рис. 1.10).

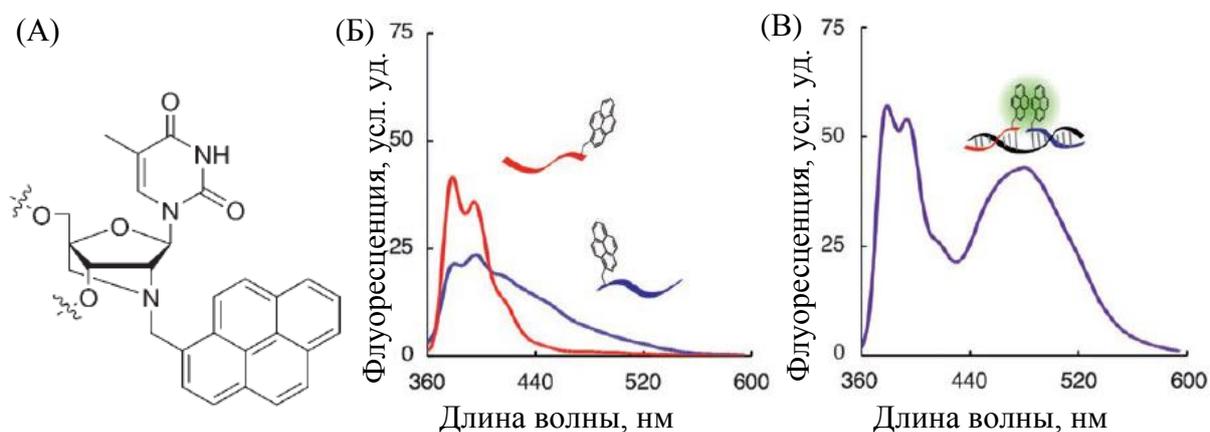


Рис. 1.10. (А) Структура *N*2'-(пирен-1-илметил)-2'-амино-LNA тимидина (Y). Спектры флуоресценции зондов 5'-d(CA^LCCA^LAC^Y) и 5'-d(YCTT^LCC^LAC^LA), где N^L – LNA нуклеотид (Б) и их дуплексов с комплементарной ДНК-мишенью (В) [189].

При связывании предложенных зондов с комплементарными РНК- или ДНК-мишенями в спектрах флуоресценции регистрировали появление эксимерной флуоресценции. Кроме того, эти зонды оказались весьма чувствительными к однонуклеотидным заменам в составе модельных НК-мишеней. Авторы работы считают созданные зонды перспективными инструментами для детекции SNP.

В работе [132] тандемные пиренильные зонды на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих терминальные модификации, использовали для детекции мРНК сенсорина в клеточном экстракте. Благодаря продолжительному времени жизни эксимерной флуоресценции пирена (>40 нс) по сравнению со временем жизни флуоресценции белков клеточного экстракта (~7 нс) авторам удалось селективно детектировать эксимерную

флуоресценцию (отношение сигнала к шуму = 10) с использованием флуоресцентной спектроскопии с разрешением во времени. Стоит отметить работу [139], в которой на базе тандемных эксимер-образующих зондов была создана система для количественного анализа модельной ДНК-мишени. Данная система детекции подразумевает амплификацию сигнала пиренильного эксимера за счет сборки конкатемерного комплекса из пирен-меченых шпилечных олигонуклеотидов в присутствии ДНК-мишени.

Флуоресцентные эксиплекс-образующие тандемные зонды, при гибридизации которых с ДНК-мишенью происходит образование эксиплекса между пиренильным флуорофором и другим ароматическим остатком, например, остатком нафталина или бензола, были описаны в работе [130]. В этом случае при образовании эксиплекса возбуждённый пиренильный остаток выступал в качестве акцептора электрона, а остаток нафталина или бензола – в качестве донора. Такие тандемные конструкции на основе олигодезоксирибонуклеотидов были использованы как перспективные флуоресцентные зонды для детекции однонуклеотидных полиморфизмов. Преимуществом этого подхода является возможность мультиплексной детекции ДНК-мишеней, так как существует возможность создания зондов, способных образовывать разные эксиплексы. Однако, эксиплексная флуоресценция склонна подвергаться тушению, поэтому авторы добавляли в определяемые образцы органические растворители, например, трифторэтанол.

Еще один интересный вариант пиренильных зондов – "молекулярных маяков" был опубликован в работах [34,140,146,157,161,190,191]. "Молекулярные маяки" в данном случае работают как переключатели, которые "выключены" в отсутствие НК-мишени и "включены" в комплексе с НК-мишенью.

В работе [157] описаны "молекулярные маяки" для определения количества модельной ДНК-мишени в реальном времени. Предложенные "молекулярные маяки" представляют собой олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие от одного до четырех остатков пирена, введенные на 5'-конец олигонуклеотида посредством длинного разветвленного линкера, и тушитель ДАВСУЛ на 3'-конце. В отсутствие ДНК-мишени пиренильные остатки зонда сближены с тушителем и происходит эффективное тушение флуоресценции пирена. При связывании зонда с ДНК-мишенью структура типа "стебель-петля" раскрывается и флуорофорная группа удаляется от тушителя, что приводит к увеличению флуоресценции пирена, пропорциональному концентрации ДНК-мишени (Рис. 1.11).

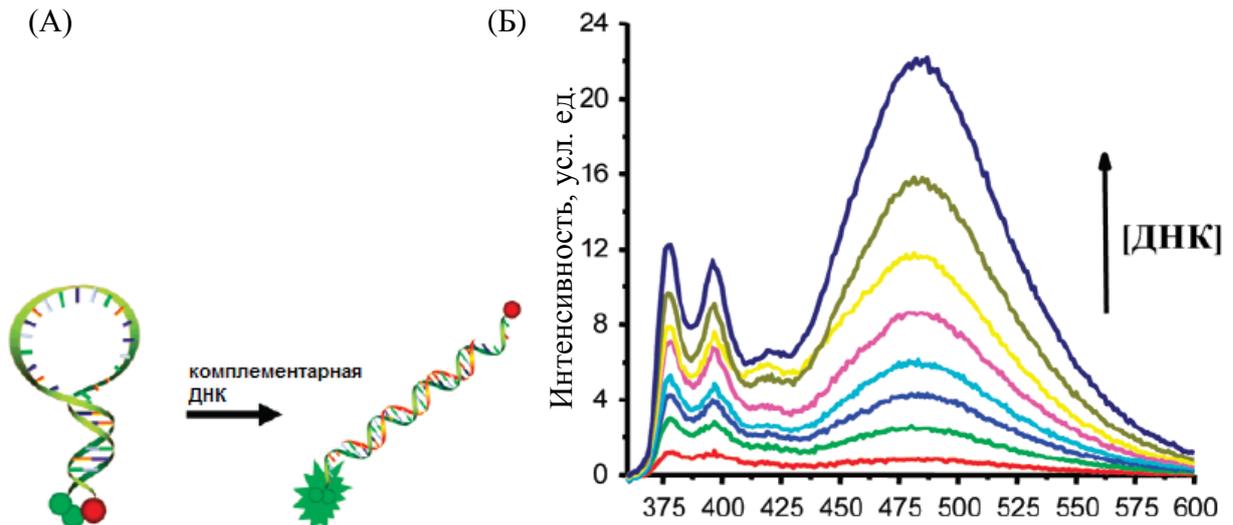


Рис. 1.11. (А) Схема гибридизации "молекулярного маяка" с комплементарной ДНК-мишенью. (Б) Спектры флуоресценции 5'-биспиренильного зонда 5'-d(CCTAGCTСТАААТСАСТАТGGTCGCGCTAGG)-DABCYL-3' в присутствии повышающихся концентраций ДНК-мишени [157].

Возможен и другой механизм действия "молекулярного маяка" на основе олигонуклеотида, содержащего по одному остатку пирена на 3'- и 5'-конце (Рис. 1.12) [140]. В этом варианте, когда пиренильный "молекулярный маяк" находится в конформации шпильки, пиренильные остатки сближены и в спектрах флуоресценции регистрируют интенсивную эксимерную флуоресценцию. При гибридизации с ДНК-мишенью происходит пространственное удаление флуорофоров друг от друга, что приводит к исчезновению эксимерной и увеличению мономерной флуоресценции.

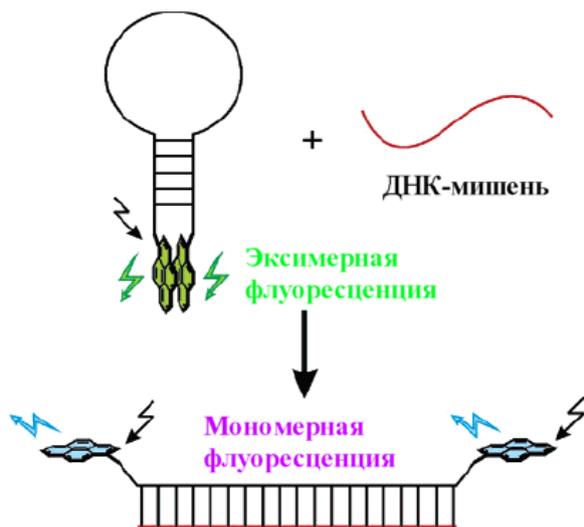


Рис. 1.12. Схематическое представление принципа переключения эксимер-мономер "молекулярного маяка", предложенного в работе [140].

Еще один вариант "молекулярного маяка" на основе олигонуклеотидов, содержащих три непоследовательно введенные вставки N2'-(пирен-1-илметил)пиперазин-2'-амино-UNA

нуклеотидов (см. Табл. 1.4), был предложен в работе [190]. В отсутствие РНК-мишени пиренильные остатки зонда пространственно удалены друг от друга.

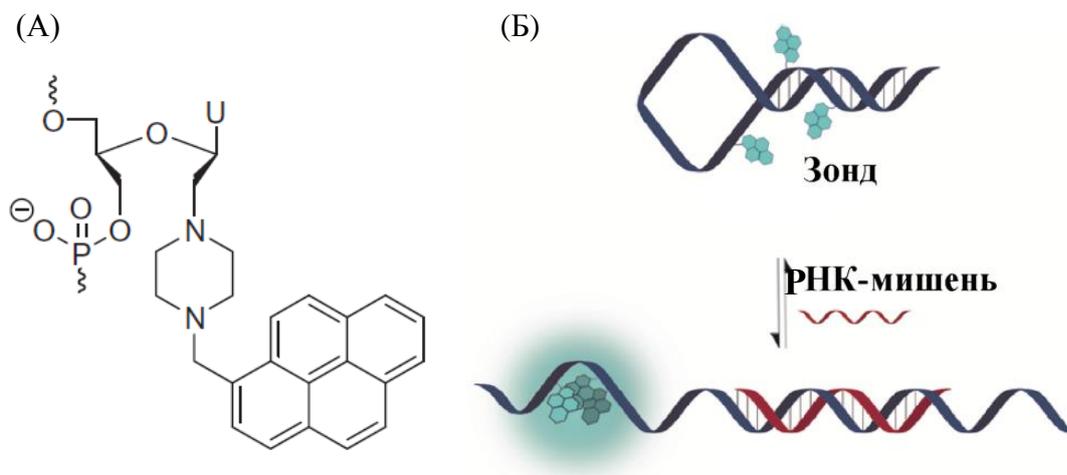


Рис. 1.13. (А) Структура *N*2'-(пирен-1-илметил)пиперазин-2'-амино-UNA уридина. (Б) Схема гибридизации "молекулярного маяка" с комплементарной РНКмишенью [190].

При связывании зонда с РНК-мишенью зонд раскрывается, а 5'-концевой фрагмент зонда, содержащий пирен-модифицированные нуклеотиды, остается одноцепочечным, при этом пиренильные остатки сближаются друг с другом, что приводит к появлению эксимерной флуоресценции пирена. Было показано, что предложенные зонды могут быть использованы для визуализации внутриклеточной циклической *ciRS-7* РНК в клетках линии H1299 [190].

Благодаря оригинальности конструкций и высокой чувствительности созданных зондов пиренильные зонды могут быть использованы как для детекции НК-мишеней *in vitro*, так и для визуализации РНК-мишеней в клетках.

1.3.2. Исследование вторичной и третичной структуры НК

Исследование вторичной и третичной структуры РНК важно не только для понимания биологических функций РНК, но и для выбора потенциальных РНК-мишеней для терапевтических агентов. Флуоресцентные зонды на основе пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов позволяют следить за процессом формирования пространственной структуры мРНК [108,122,192,193], определять доступные сайты для связывания антисенс-олигонуклеотидов с нативной РНК [83,86], определять вторичную и третичную структуру мРНК [18,194].

Silverman и соавторы [108,122] вводили пиренильную метку в составе вставок *N*2'-пирен-модифицированных 2'-дезоксирибоуридинов в 160-звенный фрагмент РНК, являющийся доменом Р4-Р6 интрона группы I *Tetrahymena*. Благодаря увеличению интенсивности

флуоресценции пирена при Mg^{2+} -зависимом образовании третичных структур РНК была исследована кинетика этого процесса.

Антисмысловая стратегия имеет высокий потенциал для лечения заболеваний и изучения функций генов путём подавления их экспрессии на стадии трансляции. Авторы работ [83,86] продемонстрировали возможность применения монопиренильных [83] и биспиренильных [86] конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции доступных сайтов связывания нативных 16S рРНК и 5S рРНК *E. coli* с антисмысловыми олигонуклеотидами. При этом сигналом о доступности сайтов для гибридизации выступало увеличение интенсивности мономерной или эксимерной флуоресценции, соответственно.

В работе [18] вторичную и третичную структуру 678-звенного фрагмента мРНК гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1* исследовали методом гибридизации с 5'-биспиренильными конъюгатами олигодезоксирибонуклеотидов в качестве флуоресцентных зондов. При связывании таких зондов с сильно структурированными участками РНК наблюдалось тушение эксимерной флуоресценции, тогда как связывание с менее структурированными областями сопровождалось её значительным увеличением. Авторами работы [195] 3'-монопиренильные производные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) были предложены в качестве перспективных изоэнергетических зондов для выявления одноцепочечных фрагментов в РНК. Интересно отметить, что в данном случае ключевую роль играли не флуоресцентные свойства пиренильного остатка, а его способность к термической стабилизации дуплексов зондов с мишенью.

В работе [196] был предложен интересный метод флуоресцентной визуализации перехода структуры GC-богатого дуплекса из В-формы в Z-форму под действием солей. Для этого авторы последовательно вводили в состав 5'-d(GC)₇ вставки C8-(1-этинилпирен)-2'-дезоксирибогуанозина (^{Pet}G) и C5-[3-(1-пиренкарбоксамид)пропинил]-2'-дезоксирибоцитидина (^{Py}C) (Рис. 1.14). При низких концентрациях солей в растворе (0.1 М NaCl) дуплекс находится в правозакрученной В-форме, которая характеризуется большим расстоянием между остатками пирена, и в спектрах флуоресценции регистрируют мономерную флуоресценцию пирена. При повышении концентрации солей (до 4.5 М NaCl) тип дуплекса меняется на левозакрученную Z-форму, в которой пиренильные остатки сближены и образуют эксимер.

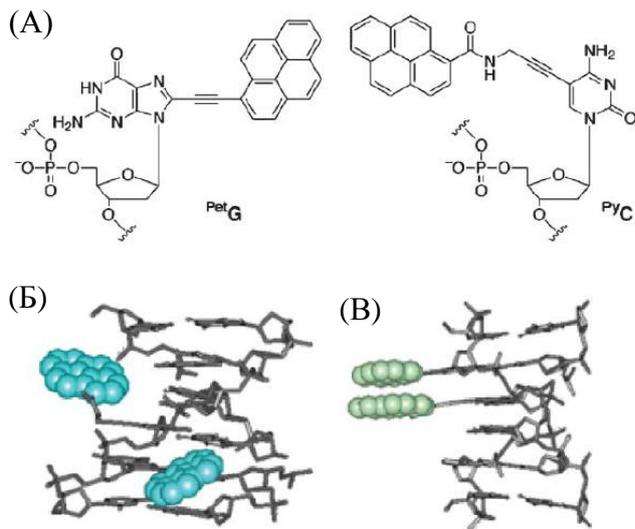


Рис. 1.14. (А) Структуры C8 -(1-этинилпирен)-2'-дезоксирибогуанозина (PetG) и C5 -[3-(1-пиренкарбоксамид)пропинил]-2'-дезоксирибоцитидина (PyC). Молекулярные модели В-формы ДНК-дуплекса, содержащего вставки PetG и PyC (Б) и Z-формы этого ДНК-дуплекса (В).

В нескольких работах описано введение пиренильных остатков в G-богатые олигонуклеотиды для детекции образования G-квадруплексов [197–199]. Как правило, в таких работах пиренильные остатки вводят в качестве терминальных модификаций и при формировании G-квадруплекса регистрируют эксимерную флуоресценцию пирена. Альтернативный вариант представлен в работе [199], в которой на 5'-конец G-богатого олигонуклеотида вводили C8 -(1-этинилпирен)-2'-дезоксирибоаденин (Рис. 1.15).

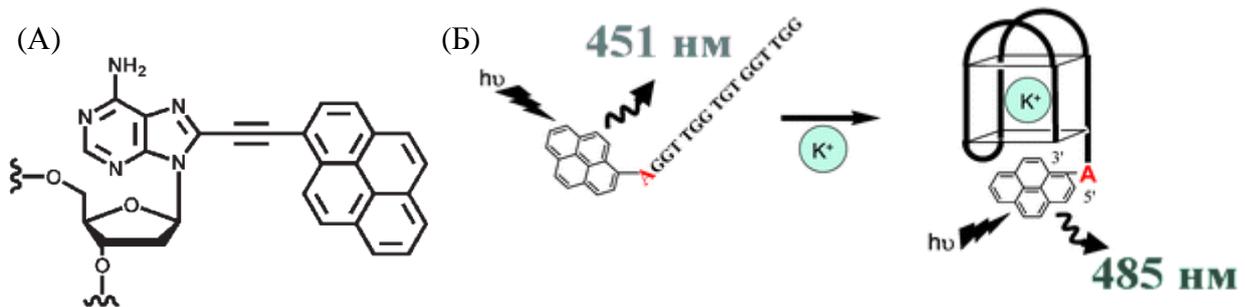


Рис. 1.15. (А) Структура C8 -(1-этинилпирен)-2'-дезоксирибоаденина. (Б) Схематическое представление принципа детекции образования G-квадруплекса, предложенного в работе [199].

В отсутствие ионов калия зонд находится в одноцепочечном состоянии, при этом в спектрах флуоресценции регистрировали полосу с максимумом при 451 нм. Добавление в раствор солей калия приводило к формированию стабильного G-квадруплекса, в котором пиренильный остаток образует эксиплекс с соседним гуанином в цепи, в итоге в спектрах флуоресценции появлялась новая полоса с максимумом при 485 нм.

Благодаря своей высокой чувствительности к ближайшему окружению пиренильные зонды являются востребованными в сфере исследования структуры нуклеиновых кислот.

1.3.3. Исследование мутаций в ДНК и РНК

Разработка методов диагностики генетических нарушений является актуальной задачей молекулярной биологии и фундаментальной медицины. Точечные мутации, инсерции и делеции, являются наиболее распространёнными вариациями в человеческом геноме и играют важную роль как биомедицинские маркеры. SNPs (single nucleotide polymorphisms) - это однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в некоторой популяции имеются различные варианты последовательностей (аллели), причём редкий аллель встречается с частотой не менее 1 %. Однонуклеотидные полиморфизмы отвечают за 90% вариабельности генома человека и могут быть ассоциированы с тяжёлыми наследственными заболеваниями, а также с индивидуальной реакцией на патогены, лекарственные вещества или вакцины. Один из широко распространённых методов детекции SNP – аллельспецифичная гибридизация. Рассмотрим использование пиренильных производных олигонуклеотидов в рамках этого метода.

В основе методов специфической детекции SNP в ДНК-мишенях лежит использование зондов, способных демонстрировать разный характер флуоресцентного отклика при связывании с комплементарными НК-мишенями и мишенями, содержащими однонуклеотидное несоответствие. Как правило, дизайн таких зондов основан на выборе таких положений олигонуклеотида для мечения пиреном, при которых зонд в присутствии полностью комплементарной НК-мишени демонстрирует высокую интенсивность флуоресценции благодаря вытеснению пиренильных остатков в бороздку дуплекса, а при связывании с НК-мишенью, содержащей SNP, пиренильные остатки интеркалируют внутрь НК-дуплекса, что приводит к тушению флуоресценции пирена соседними азотистыми основаниями (Рис. 1.16) [8].

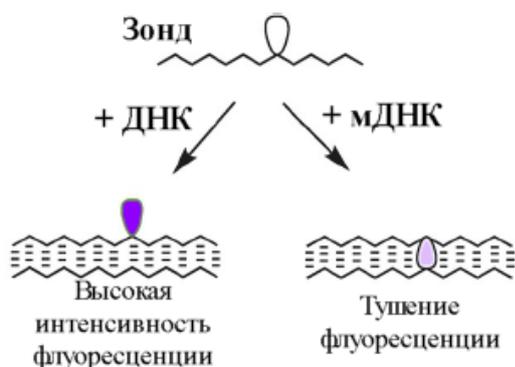


Рис. 1.16. Схематическое изображение принципа действия зондов для детекции SNP в ДНК-мишенях. ДНК-комплементарная ДНК-мишень, мДНК-ДНК-мишень, содержащая мисматч.

Среди большого количества работ, посвященных синтезу и исследованию пирен-меченых олигонуклеотидных зондов для детекции SNP в ДНК-мишенях, наиболее удачными вариантами зондов являются олигонуклеотиды, содержащие остатки пирена, введенные по гетероциклическому основанию [49,52,200–203]. Среди них стоит отметить конъюгаты

олигонуклеотидов с введенными C5-[3-(1-пиренкарбоксамидо)пропинил]-производными 2'-дезоксиридина (см. Табл. 1.4), которые были успешно использованы для выявления мутаций гена рака молочной железы 1 (BRCA 1) [49,201].

Hrdlicka и соавторы опубликовали серию работ, посвященных синтезу и исследованию свойств олигонуклеотидов, содержащих пиренильные остатки, введенные по гетероциклическому основанию LNA и α -L-LNA нуклеотидов посредством коротких жестких линкеров [52,202,203] (см. Табл. 1.2). Авторы предположили, что введение модификации в составе конформационно заблокированных LNA и α -L-LNA мономеров в зонд будет способствовать более точному позиционированию пиренильных остатков в бороздке дуплекса в случае комплементарной мишени или внутри дуплекса в случае ДНК-мишени, содержащей SNP. Действительно, зонды с такими вставками обладали высоким квантовым выходом (до 0.80) и способностью распознавать мисматчи в ДНК (см., например, Рис. 1.17).

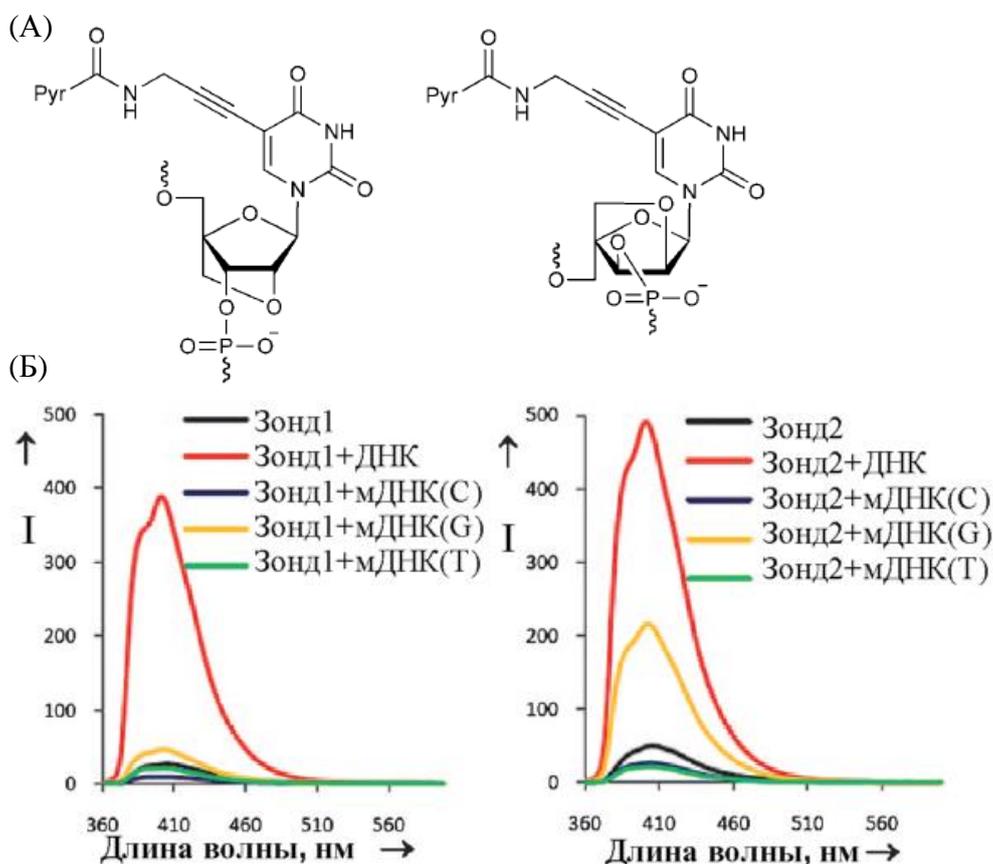


Рис. 1.17. (А) Структуры C5-[3-(1-пиренкарбоксамидо)пропинил]-производных LNA и α -L-LNA уридина (W и M, соответственно); Pyr – остаток пирена. (Б) Спектры флуоресценции зонда 1 5'-d(CG CAA GWG AAC GC) и зонда 2 5'-d(CG CAA GMG AAC GC) и их дуплексов с комплементарной (ДНК) или содержащей мисматч (мДНК) ДНК-мишенью [202].

Существенно реже в литературе встречаются пиренильные зонды для детекции SNP в РНК-мишенях [45,110,189,204]. В работе [45] в качестве селективного зонда для детекции SNP

был предложен короткий 9-звенный олигодезоксирибонуклеотид, содержащий четыре последовательно введенные вставки 5-(1-пирентриазол-4-ил)-2'-дезоксисуридина в середину цепи (Рис. 1.18). Зонд образовывал стабильные дуплексы с комплементарной РНК-мишенью ($\Delta T_m = +17.5$ °С по сравнению с немодифицированным дуплексом) за счет π - π -стэкинга пиренильных остатков в большой бороздке дуплекса.

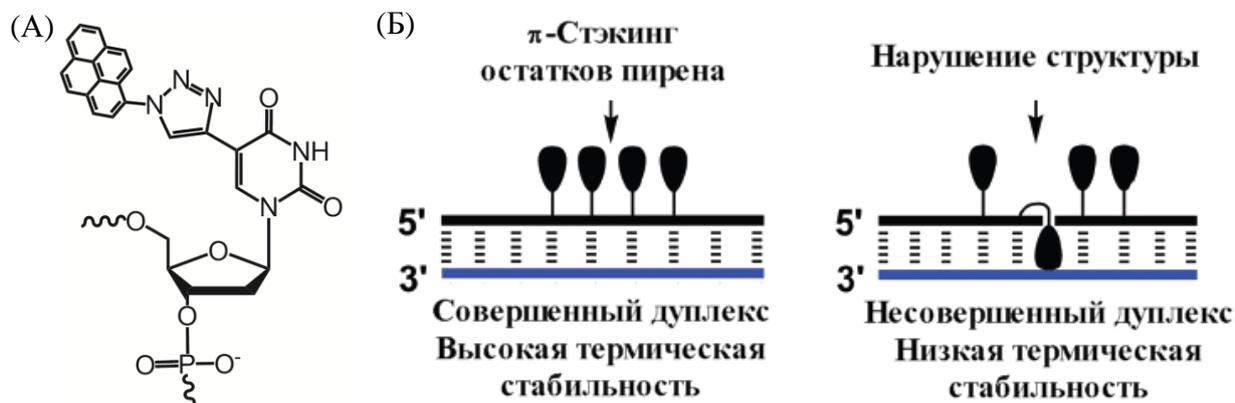


Рис. 1.18. (А) Структура 5-(1-пирентриазол-4-ил)-2'-дезоксисуридина. (Б) Схематическое изображение принципа действия зондов для детекции SNP в РНК-мишенях [45].

Однако, при связывании этого зонда с РНК-мишенью, содержащей мисматч в середине цепи, наблюдали нарушение взаимодействия пиренильных остатков и, как следствие, резкое снижение термостабильности дуплекса ($\Delta T_m = -12.5$ °С независимо от типа мисматча).

Второй вариант зондов, чувствительных к SNP в РНК-мишенях, представлен короткими 13-звенными олигодезоксирибонуклеотидами с центральной вставкой LYL_YL, где L – LNA нуклеотид, а Y – 2'-O-(1-пиренилметил)уридин (Рис. 1.19) [204].

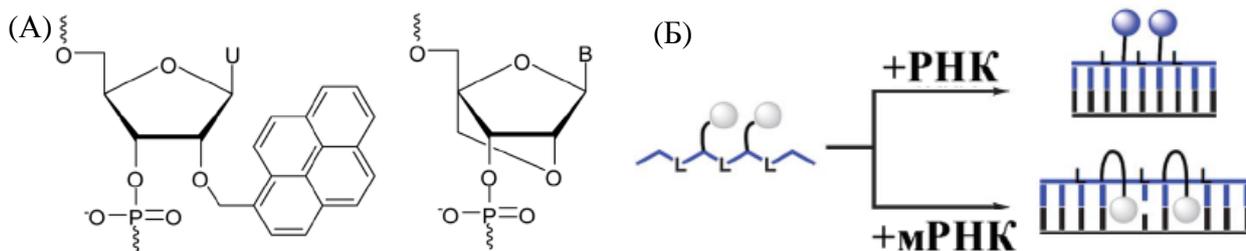


Рис. 1.19. (А) Структуры 2'-O-(1-пиренилметил)-уридина и LNA нуклеотида (B=A, C, G, T). (Б) Схематическое изображение принципа действия зондов для детекции SNP в РНК-мишенях. РНК – комплементарная РНК-мишень, мРНК – РНК-мишень, содержащая мисматч [204].

При гибридизации этих зондов с комплементарной РНК-мишенью происходило значительное увеличение интенсивности мономерной флуоресценции пирена (до 119 раз при 376 нм) вследствие экспозиции пиренильных остатков в бороздке дуплекса. В случае РНК-мишени, содержащей центральный мисматч, интенсивность флуоресцентного сигнала была

существенно ниже (до 19 раз), так как пиренильные остатки интеркалируют внутрь НК-дуплекса и подвергаются тушению соседними азотистыми основаниями.

Большое количество работ по выявлению мутаций в НК-мишенях подтверждают перспективность использования пиренильных зондов в области исследования SNP.

1.3.4. Агенты для связывания с дцДНК

Разработка агентов, способных специфически связываться с дцДНК-мишенями является актуальной задачей молекулярной биологии и медицины в связи с поиском перспективных инструментов для регуляции экспрессии генов путем ингибирования транскрипции, детекции хромосомной ДНК и коррекции мутаций ДНК. Предложено два подхода к созданию таких агентов, подразумевающих использование пирен-модифицированных производных олигонуклеотидов, а именно 1) триплекс-формирующие олигонуклеотиды, содержащие TINA мономеры [164,205–209], и 2) двуцепочечные «зиппер»-зонды, способные расплетать дцДНК, связываясь с каждой из цепей (Invader зонды) [92,93,105,112–114,119–121,204,210,211].

В рамках первого подхода Pedersen, Filichev и соавторы вводили ненуклеотидную вставку на основе производного (*R*)-1-*O*-[4-1-(1-этинилпирен)-фенилметил]глицерина (TINA мономер) в триплекс-формирующие олигонуклеотиды, что приводило к стабилизации параллельных триплексов этих олигонуклеотидов с дцДНК (Рис. 1.20А).

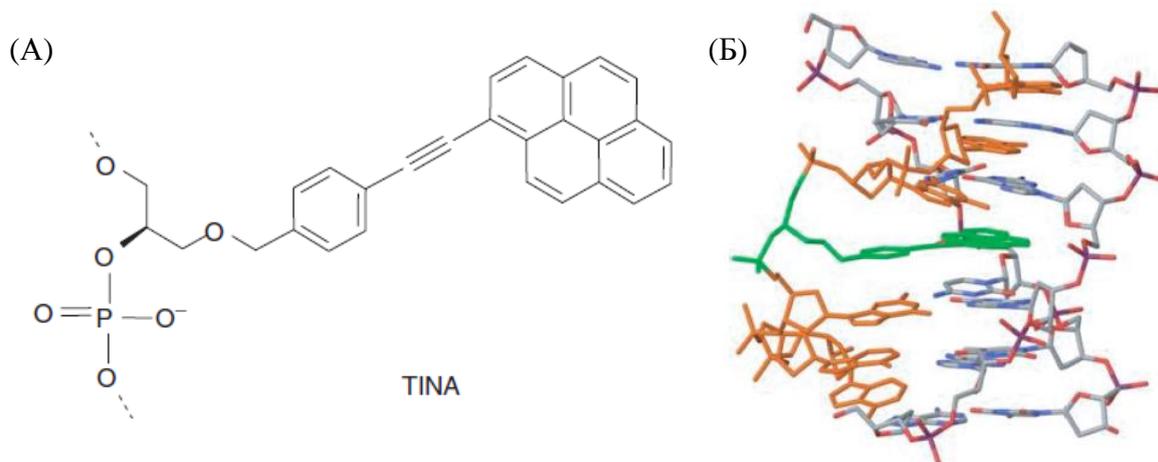


Рис. 1.20. (А) Структура ненуклеотидной вставки TINA. (Б) Молекулярная модель триплекса G-богатого олигонуклеотида, содержащего вставку TINA, с дцДНК-мишенью [166].

Стабилизирующий эффект вставок зависел от pH среды, длины олигонуклеотида, количества и положений вставок [164,205–209]. Расчет молекулярных моделей триплексов олигонуклеотидов, содержащих вставку TINA, с дцДНК-мишенью показал, что пиренильный остаток интеркалирует в дуплекс дцДНК-мишени, а фенильный остаток участвует в π -стэкинге с азотистыми основаниями триплекс-формирующего олигонуклеотида (Рис. 1.20Б) [166].

Второй подход был предложен относительно недавно. Так, Hrdlicka и соавторы опубликовали большую серию работ, посвященных синтезу и исследованию свойств двуцепочечных Invader зондов, которые демонстрируют высокое сродство к дцДНК-мишеням [92,93,105,112–114,119–121,204,210,211]. Invader зонды представляют собой дцДНК-зонды, содержащие пиренильные остатки в противоположных цепях, расположенные со сдвигом на один нуклеотид в направлении к 5'-концу по отношению друг к другу (конституция «+1 зиппера»). Такое расположение пиренильных заместителей способствует тому, что два пиренильных остатка стремятся интеркалировать в одно и то же положение образующегося дуплекса, приводя к раскручиванию ДНК-спирали и дестабилизации дцДНК-зонда. С другой стороны, каждая из цепей этого двуцепочечного Invader зонда имеет повышенное сродство к комплементарной цепи ДНК-мишени благодаря интеркаляции пиренильных остатков внутрь образующихся дуплексов (Рис. 1.21А). Авторы описали и детально исследовали различные варианты Invader зондов, содержащих от одного до трех «+1 зиппер» мотивов, образованных 2'-пирен-модифицированными нуклеотидами (Рис. 1.21Б).

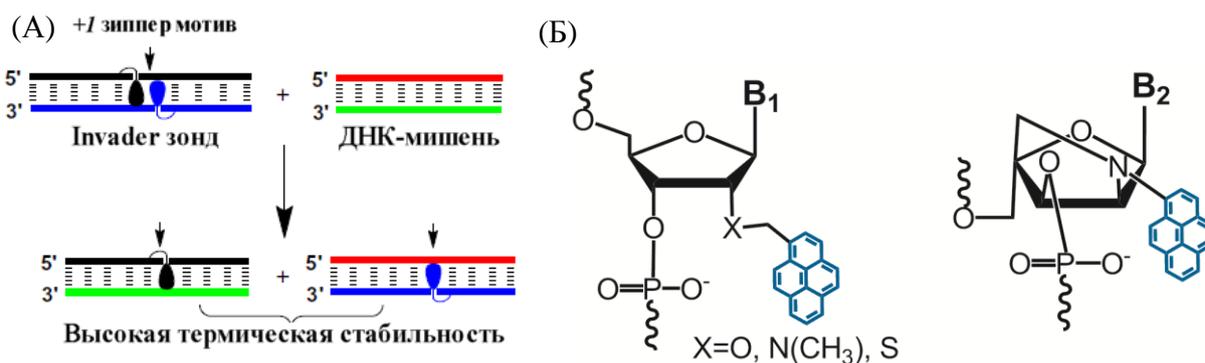


Рис. 1.21. (А) Схематическое изображение принципа действия Invader зондов для связывания дцДНК-мишеней. (Б) Структуры мономеров, использованных в качестве интеркаляторов в составе Invader зондов. B₁= A, U, C, G; B₂=A, T.

В работе [211] была продемонстрирована возможность визуализации Y-хромосом в линии клеток почек быка MDBK (NBL-1) с использованием коротких 11-звенных Су3-меченых Invader зондов, направленных на DYZ-1 сателлитный участок Y-хромосом (~6·10⁴ tandemных повторов) (Рис. 1.22).

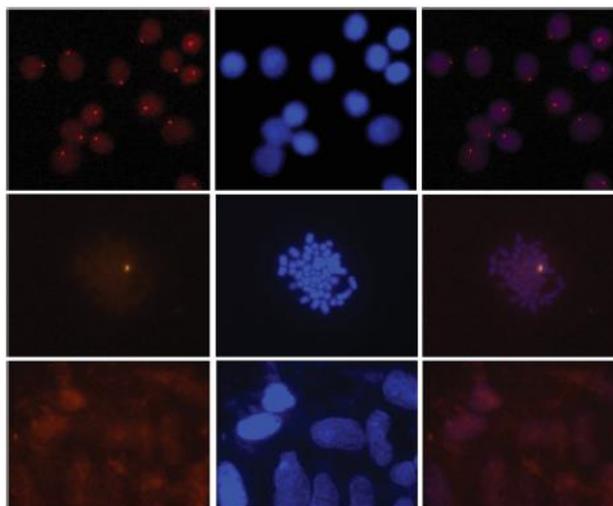


Рис. 1.22. Визуализация Y-хромосом в клетках линии MDBK (NBL-1) с использованием Cy3-меченых Invader зондов методом флуоресцентной гибридизации *in vitro* в неденатурирующих условиях. Канал флуоресценции Cy3 (столбец слева), канал DAPI (средний столбец), объединенный канал (столбец справа) [211].

В работе [112] на основе Invader зондов в качестве распознающего элемента была разработана система детекции 28-звенных фрагментов дцДНК таких важных возбудителей кишечных инфекций как *Salmonella*, *Campylobacter* и *E. coli*. Предложенная система детекции характеризуется высокой специфичностью и позволяет достоверно детектировать определяемые дцДНК-мишени при концентрациях от 20-55 пМ.

Как видно из обзора литературы, пирен является высокочувствительной к ближайшему окружению флуоресцентной меткой. Использование пиренильных зондов для исследования структуры и функций нуклеиновых кислот, а также их количественного определения в растворе и визуализации в клетках весьма перспективно. Большая часть работ по созданию пиренильных зондов на основе олигонуклеотидов ограничивается исследованиями их свойств на модельных системах, и лишь небольшая часть работ выполнена на реальных биологических объектах. Основным препятствием к активному использованию пиренильных зондов на клеточных системах является перекрывание спектров испускания мономерной флуоресценции пирена с автофлуоресценцией клеток. Перспективным подходом к преодолению этого препятствия является создание пиренильных эксимер-образующих зондов, флуоресценция которых сдвинута в длинноволновую область. Актуальным, на наш взгляд, является разработка простых универсальных подходов к получению пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих остатки пирена в заданных положениях олигонуклеотидной цепи. Разработке таких подходов, а также исследованию и применению созданных с использованием этих подходов зондов посвящена данная диссертация.

Глава 2. НОВЫЕ ПИРЕНИЛЬНЫЕ ЭКСИМЕР-ОБРАЗУЮЩИЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ ОЛИГО(2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ) ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ РНК (РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ)

Как было отмечено ранее в обзоре литературы, в настоящее время одними из наиболее достоверных методов исследования нуклеиновых кислот является методы, основанные на использовании флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, комплементарных участкам исследуемой НК-мишени. Флуоресцентные гибридизационные зонды могут быть использованы для исследования функций и структурных особенностей, точечных мутаций, локализации, динамики и упаковки различных внутриклеточных НК-мишеней, например, ДНК, протяженных структурированных мРНК или некодирующих РНК, а также малых регуляторных РНК. Несмотря на достаточно большое число известных флуоресцентных зондов для детекции НК [8,212–215], до сих пор постоянно растет интерес к разработке новых зондов с улучшенными и контролируемыми свойствами. В каждом конкретном случае для того, чтобы контролировать гибридизационные свойства, специфичность зондов, а также возникновение и интенсивность специфического сигнала зондов в комплексе с мишенью, при дизайне зондов необходимо принимать во внимание структурные особенности НК-мишеней, флуоресцентной метки и образующегося гибридного дуплекса.

К настоящему моменту было предложено несколько типов флуоресцентных зондов на основе пирен-меченых олигонуклеотидов, демонстрирующих значительное изменение сигнала при связывании с мишенью и высокую селективность к типу НК-мишени [8]. Среди них пирен-меченые эксимер- и эксиплекс-образующие зонды, обладающие рядом достоинств, что делает их многообещающими инструментами диагностики и исследования [8,216–218]. Во-первых, стоит отметить большой Стоксов сдвиг флуоресцентного сигнала эксимера или эксиплекса [11,15], который наблюдается при связывании зонда с мишенью (до 130 нм), что позволяет легко отличить специфический сигнал даже при условии избытка несвязанных зондов в среде. Во-вторых, высокая фотостабильность и продолжительное время жизни флуоресценции (>40 нс) делают пирен-меченые зонды перспективными инструментами время-разрешенных методов [129]. В-третьих, особенностью пиренильных зондов является чувствительность флуоресценции даже к небольшим изменениям ближайшего микроокружения пиренильных остатков [8,15,22]. Преимущества пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов и все растущий интерес исследователей к использованию этих производных в молекулярной биологии, биоорганической химии и биотехнологии подтолкнули нас к созданию и изучению свойств новых типов конструкций чувствительных флуоресцентных зондов, способных селективно детектировать молекулы РНК в растворе, а также пригодных для визуализации внутриклеточных РНК в клетках. В качестве мишеней нами были выбраны участки мРНК гена

множественной лекарственной устойчивости *mdr 1* (нуклеотиды 120-137 и 315-336) и 28S рибосомальной РНК (нуклеотиды 2319-2361). Эти участки РНК были выбраны на основании литературных данных о структуре и доступных сайтах гибридизации [219,220]. Ген *mdr1* кодирует трансмембранный АТФ-зависимый белок Р-гликопротеин (Pgp), который снижает внутриклеточную концентрацию соединений различной химической природы, в том числе и химиотерапевтических препаратов. Гиперэкспрессия гена *mdr1* приводит к развитию множественной лекарственной устойчивости клеток, осложняющей химиотерапию онкозаболеваний [221]. Выбор 28S рибосомальной РНК в качестве модельной мишени в данной работе был обусловлен высоким содержанием этой РНК в клетках.

2.1. Линейные зонды на основе 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов)

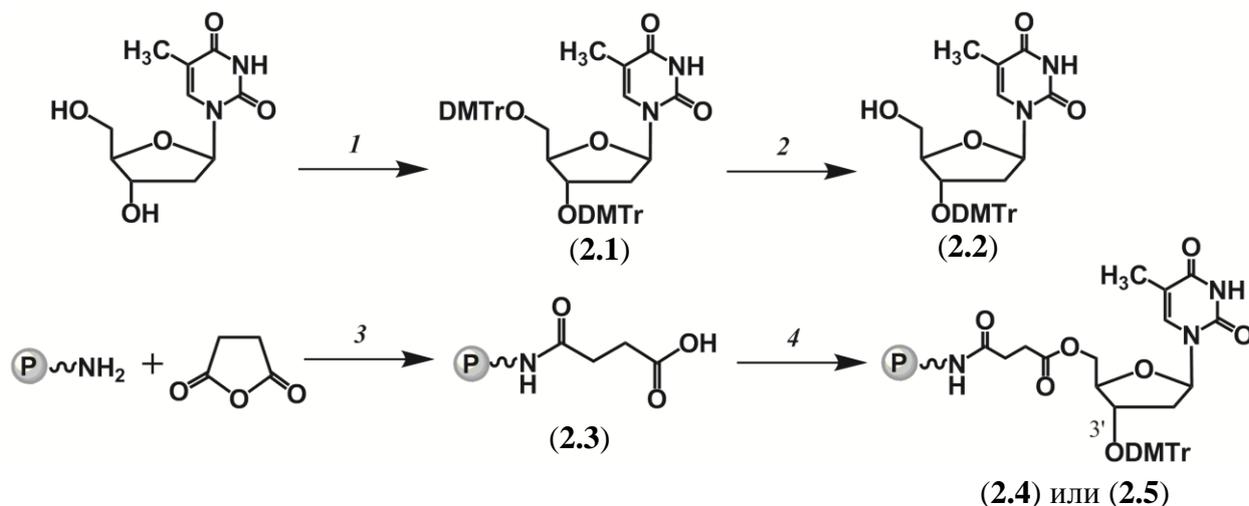
При конструировании олигонуклеотидных производных важно выбрать такое положение, модификация которого влияла бы наименьшим образом на способность образовывать стабильные дуплексы с комплементарными мишенями. С этой точки зрения, как уже отмечалось в обзоре литературы (раздел 1.2.), наиболее перспективными модификациями являются введение функциональных групп в 2'-положение углеводного фрагмента нуклеозидов, а также концевые модификации, так как искажения в структуре НК-дуплекса при этом оказываются минимальными. Для введения пиренильных группировок в 2'-положение олигонуклеотида был выбран подход, предложенный и разработанный в нашей лаборатории, а именно 2'-функционализация через 2'-фосфат, основанная на использовании в качестве предшественника олигонуклеотида с введенным при твердофазном синтезе рибонуклеотидным звеном [222]. Для повышения устойчивости к деградации нуклеазами нами было предложено дополнительно модифицировать 2'-биспиренильные зонды на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) путем введения тимидина на 3'-конец посредством терминальной 3'-3'-межнуклеозидной фосфодиэфирной связи (3'-«инвертированный» тимидин), так как такой тип модификации олигонуклеотидов существенно повышает их устойчивость к нуклеазам двойного спектра действия [223].

2.1.1. Синтез 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), содержащих «инвертированный» тимидин на 3'-конце

Первым этапом работы было получение полимерных носителей с присоединенным через 5'-гидроксил 3'-О-диметокситритилтимидином и использование их для синтеза олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином. Так как метод твердофазного 2'-фосфорилирования олигонуклеотидов, используемый в данной работе, подразумевает стадию деблокирования 2'-О-TBDMS-групп в присутствии F⁻-аниона, в качестве

полимерного носителя для синтеза олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) со вставками рибо-звеньев использовали модифицированный полистирол, химически стабильный в данных условиях. Для получения полимерного носителя с присоединенным через 5'-гидроксил 3'-*O*-диметокситритилтимидином, сначала синтезировали 3'-*O*-диметокситритилтимидин как описано в работе [224], а затем вводили его на поверхность аминомодифицированного полистирольного носителя с использованием янтарного ангидрида согласно методике, описанной в [225] (Схема 2.1).

Схема 2.1



(1) 4,4'-Диметокситритилхлорид, пиридин, 55 °С, 48 ч; (2) ZnBr₂, диоксан, 55 °С, 48 ч; (3) *N*-метилимидазол, пиридин, 25 °С, 16 ч; (4) (2.2), TPS, *N*-метилимидазол, CH₃CN, 37 °С, 3 ч, (2.4): $\text{P} \sim \text{NH}_2$: полистирольный носитель, (2.5): $\text{P} \sim \text{NH}_2$: МПС-700.

Для синтеза 3'-«инвертированных» контрольных последовательностей олигонуклеотидов без вставок рибо-звеньев получали модифицированный полимерный носитель на основе SiO₂ (по аналогичной схеме с использованием модифицированного стекла МПС-700). Емкости полученных полимерсвязанных нуклеозидов (2.4) и (2.5) составили 118 и 53 мкмоль/г, соответственно.

Синтез всех олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) осуществляли твердофазным фосфитамидным методом на синтезаторах ASM-102U и ASM-800, используя протоколы синтеза и условия, оптимизированные для этих синтезаторов.

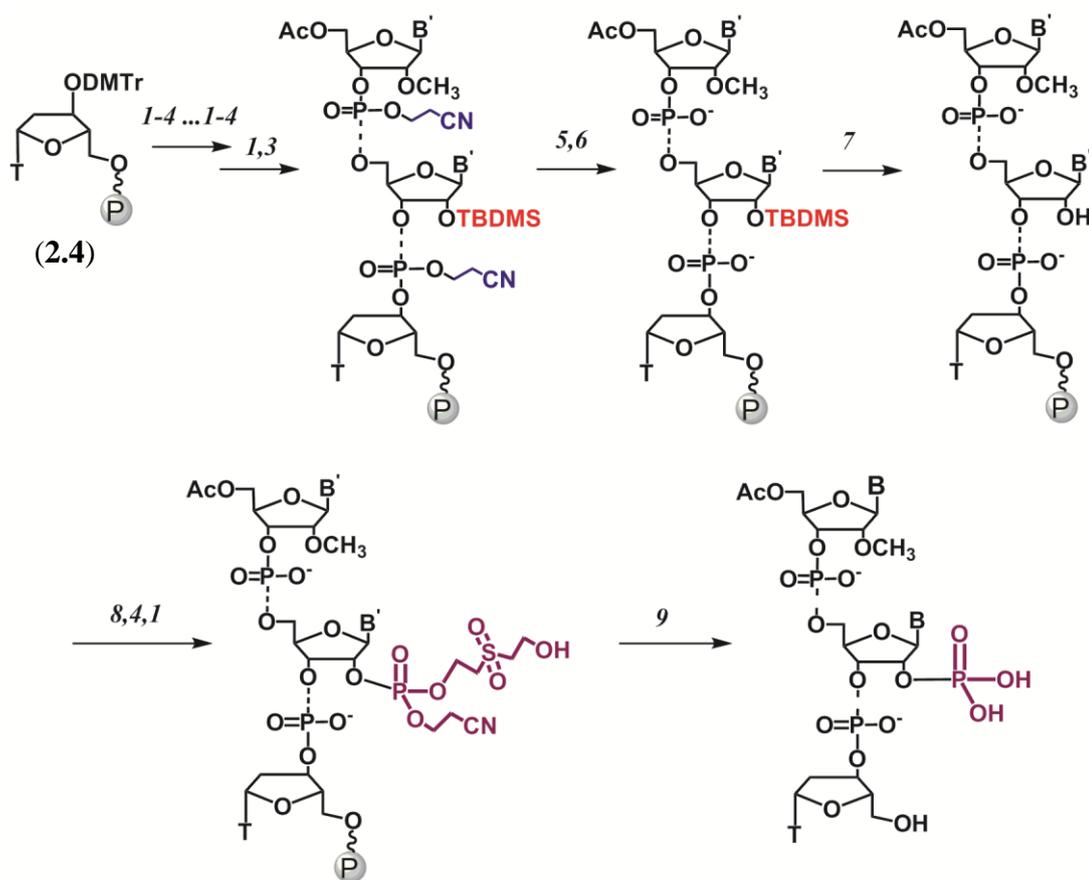
2.1.1.1. Синтез 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих 3'-концевой «инвертированный» тимидин

Для получения олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (1L1p)-(1L18p), (2L1p)-(2L8p) использовали разработанный ранее в нашей лаборатории твердофазный метод 2'-фосфорилирования [222].

На первом этапе твердофазным автоматическим фосфитамидным методом с использованием полимерного носителя (2.4) получали полимерсвязанные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), содержащие вставку (или вставки) 2'-*O*-третбутилдиметилсил-защищенного рибонуклеозида (U, C, A или G) (Схема 2.2).

С целью предотвращения фосфорилирования по 5'-гидроксилу диметокситритильную защитную группу удаляли и проводили кэпирование 5'-гидроксильной группы уксусным ангидридом (как стандартный цикл кэпирования фосфитамидного метода синтеза олигонуклеотидов) (Схема 2.2, стадии 1,3).

Схема 2.2



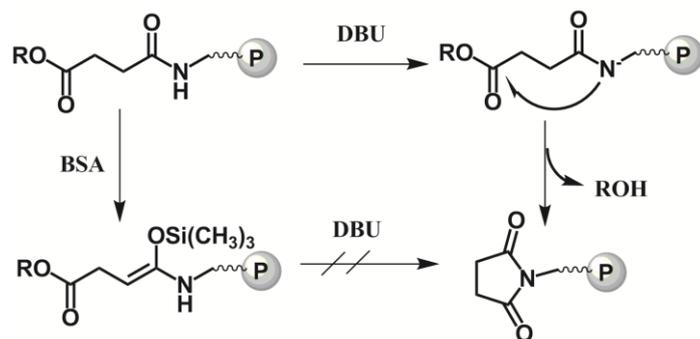
(1) 3% $\text{CHCl}_2\text{CO}_2\text{H}$ в CH_2Cl_2 ; (2) 2'-*O*-TBDMS-защищенный или 2'-*O*-метил-РНК фосфитамид, 5-(этилтио)-1*H*-тетразол, CH_3CN абс.; (3) *N*-метилимидазол в THF, $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ и 2,6-лутидин в THF; (4) I_2 в THF:Py: H_2O (75:20:2); (5) BSA:THF (1:1), 25 °C, 30 мин; (6) 5% DBU в BSA:THF (1:1), 25 °C, 30 мин; (7) *N*-метил-2-пирролидинон, TEA, TEA:3HF, 65 °C, 2 ч; (8) 2[2-(4,4'-диметокситритилокси)-этилсульфонил]-этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамид, 5-(этилтио)-1*H*-тетразол, 30 мин, CH_3CN абс.; (9) 40% CH_3NH_2 водн., 65 °C, 15 мин.

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

Известно, что в присутствии 2'-гидроксила соседняя фосфотриэфирная группа мигрирует из 3'- в 2'-положение намного легче, чем фосфодиэфирная группа [226] (Схема 2.3), поэтому 2-

цианэтильные защитные группы предварительно удаляли. Полимерсвязанный защищенный олигонуклеотид предварительно силилировали обработкой *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамида (BSA), чтобы избежать отщепление олигонуклеотида от полимерного носителя. Затем проводили удаление 2-цианэтильных групп путем β -элиминирования слабонуклеофильным основанием 1,8-дiazобидцикло[5.4.0]ундец-7-еном (DBU) в присутствии BSA (Схема 2.2, стадии 5,6) [227].

Схема 2.3



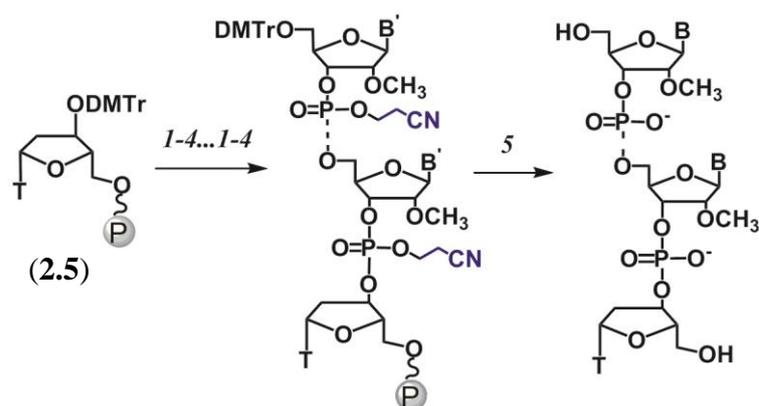
P : полистирольный носитель, R: защищенный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид).

На следующей стадии проводили удаление 2'-*O*-третбутилдиметилсилильных защитных групп обработкой триэтиламинтригидрофторидом [228] (Схема 2.2, стадия 7). Последующее 2'-фосфорилирование обнажившихся 2'-гидроксидов полимерсвязанного олигонуклеотида проводили как стандартный цикл фосфитамидного синтеза с использованием фосфитамида диметокситритилсульфонилдиэтанола при активации 5-этилтиотетразолом (время конденсации - 30 мин; Схема 2.2, стадии 8,4,1).

Удаление щелочлабильных заместителей с 2'-фосфата (двойное β -элиминирование) и защитных групп экзоциклических аминогрупп азотистых оснований, а также отделение 2'-фосфорилированного олигонуклеотида от полимерного носителя проводили обработкой полимерсвязанного олигонуклеотида 40%-ным раствором метиламина при 65 °С в течение 15 минут (Схема 2.2, стадия 9).

Олигонуклеотиды (**1L**) и (**2L**), синтезированные с использованием полимерного носителя (**2.5**) (Схема 2.4), в дальнейшем использовались в качестве контролей при электрофоретическом анализе реакционных смесей фосфатсодержащих олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), исследовании влияния модификации, введенной в 2'-положение олигонуклеотидной цепи, на устойчивость зондов к действию нуклеаз сыворотки, а также на термическую стабильность дуплексов зондов с модельной комплементарной НК.

Схема 2.4



(1) 3% $\text{CHCl}_2\text{CO}_2\text{H}$ в CH_2Cl_2 ; (2) 2'-*O*-метил-РНК фосфитамида, 5-(этилтио)-1*H*-тетразол, CH_3CN абс.; (3) *N*-метилимидазол в THF, $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ и 2,6-лутидин в THF; (4) I_2 в THF:Py:H₂O (75:20:2); (5) 40% CH_3NH_2 водн., 65 °С, 15 мин.

Ⓟ: модифицированное МПС-700, (В) В'=(не)защищенное гетероциклическое основание.

Полученные реакционные смеси анализировали электрофорезом в ПААГ. На рисунке 2.1 видно, что подвижность 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином была выше, чем у их нефосфорилированных аналогов, причем она возрастала с увеличением количества фосфорилированных звеньев в цепи.

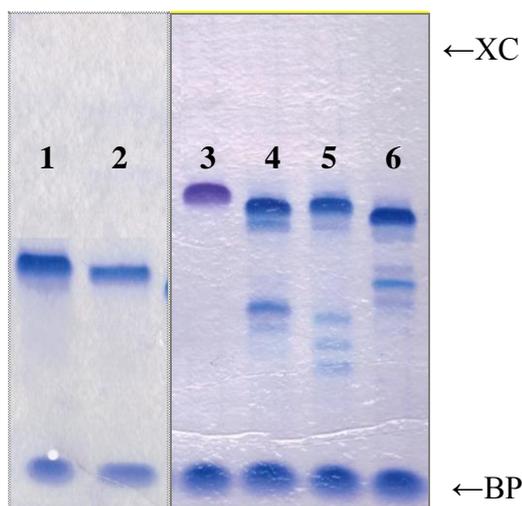


Рис. 2.1. Электрофоретический анализ реакционных смесей 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином (*2L1p*), (*1L9p*), (*1L10p*), (*1L11p*) и (дорожки 2, 4, 5 и 6, соотв.). В качестве контролей использовали немодифицированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином (*2L* и *1L*, соотв.) (дорожки 1 и 3, соотв.).

Выделение 2'-фосфорилированных олигонуклеотидов из реакционной смеси проводили методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Для подтверждения состава 2'-

фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) полученные образцы анализировали методом MALDI TOF-масс-спектрометрии. На рисунке 2.2 приведены некоторые типичные примеры полученных масс-спектров. Выходы и последовательности синтезированных олигонуклеотидов (*1L1p*)-(*1L18p*), (*2L1p*)-(*2L8p*) приведены в таблице 2.2.

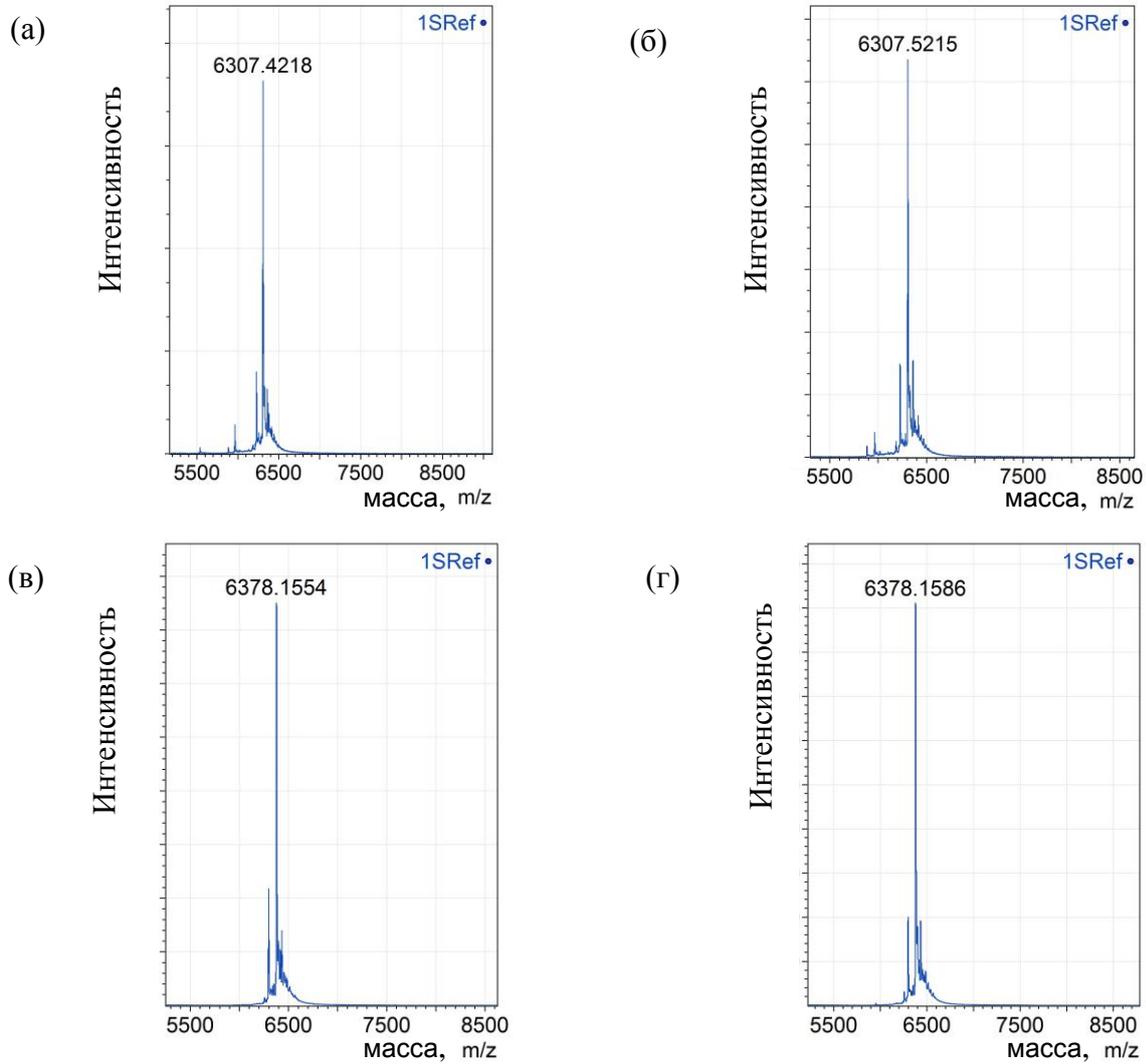


Рис. 2.2. Масс-спектры 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином *1L1p* (а), *1L7p* (б), *2L2p* (в), *2L4p* (г).

Таблица 2.1. Последовательности и выходы синтезированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов)

№	Последовательность, 5'-3'	Выход, ¹ %	Время удержив ания, ² мин	Молекулярная масса	
				Найдена, ³ m/z [M-H] ⁺	Расчи танная, m/z
<i>1L</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCUUGGA) _{3,3} dT	30.7	8.3	6241.8	6240.1
<i>2L</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCAUGGA) _{3,3} dT	28.3	8.6	6312.1	6310.2

¹Выход после выделения препаративным гель-электрофорезом в расчете на первое нуклеозидное звено.

²См. условия в 3.2.5.

³По данным MALDI-TOF масс-спектрометрии.

m – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид)_{3,3}dT - «инвертированный» тимидин.

Таблица 2.2. Последовательности и выходы синтезированных 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих «инвертированный» тимидин на 3'-конце

№	Последовательность, ¹ 5'-3'	Выход, ² %	Время удержив ания, ³ мин	Молекулярная масса	
				Расчит ано, m/z	Найдено, ⁴ m/z [M-H] ⁺
<i>1L1p</i>	5'-m(GACC ^P UCGCGCUCCUUGGA) _{3,3} dT	30.7	8.9	6303.4	6304.5
<i>1L2p</i>	5'-m(GACCUCGCGCUC ^P UUGGA) _{3,3} dT	28.3	9.0	6303.4	6307.4
<i>1L3p</i>	5'-m(GACC ^U CGCGCUCCUUGGA) _{3,3} dT	23.6	8.7	6303.4	6310.9
<i>1L4p</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCU ^P GGA) _{3,3} dT	21.2	8.7	6303.4	6308.9
<i>1L5p</i>	5'-m(GA ^P CCUCGCGCUCCUUGGA) _{3,3} dT	28.8	8.8	6303.4	6304.5
<i>1L6p</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCUUGG ^A) _{3,3} dT	23.0	8.3	6303.4	6308.3
<i>1L7p</i>	5'-m(GACCUC ^G CGCUCCUUGGA) _{3,3} dT	23.0	9.1	6303.4	6307.5
<i>1L8p</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCUUG ^P GA) _{3,3} dT	31.2	8.8	6303.4	6307.5
<i>2L1p</i>	5'-m(GAAGUC ^P CAGCCCCAUGGA) _{3,3} dT	20.6	8.7	6376.1	6378.5
<i>2L2p</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCC ^P AUGGA) _{3,3} dT	25.7	8.4	6376.1	6378.2
<i>2L3p</i>	5'-m(GAAG ^U CCAGCCCCAUGGA) _{3,3} dT	26.9	8.5	6376.1	6374.8
<i>2L4p</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCA ^P GGA) _{3,3} dT	21.4	8.9	6376.1	6378.3
<i>2L5p</i>	5'-m(GA ^P GUCCAGCCCCAUGGA) _{3,3} dT	23.3	9.1	6376.1	6378.4
<i>2L6p</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCA ^P UGGA) _{3,3} dT	27.8	8.8	6376.1	6378.2
<i>2L7p</i>	5'-m(GAAG ^P UCCAGCCCCAUGGA) _{3,3} dT	15.4	8.7	6376.1	6378.0
<i>2L8p</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCAUG ^P GA) _{3,3} dT	21.2	9.0	6376.1	6378.2

¹N^P - 2'-фосфатсодержащий нуклеозид (C, U, A или G),

²Выход после выделения препаративным гель-электрофорезом в расчете на первое нуклеозидное звено,

³См. условия в 3.2.5.

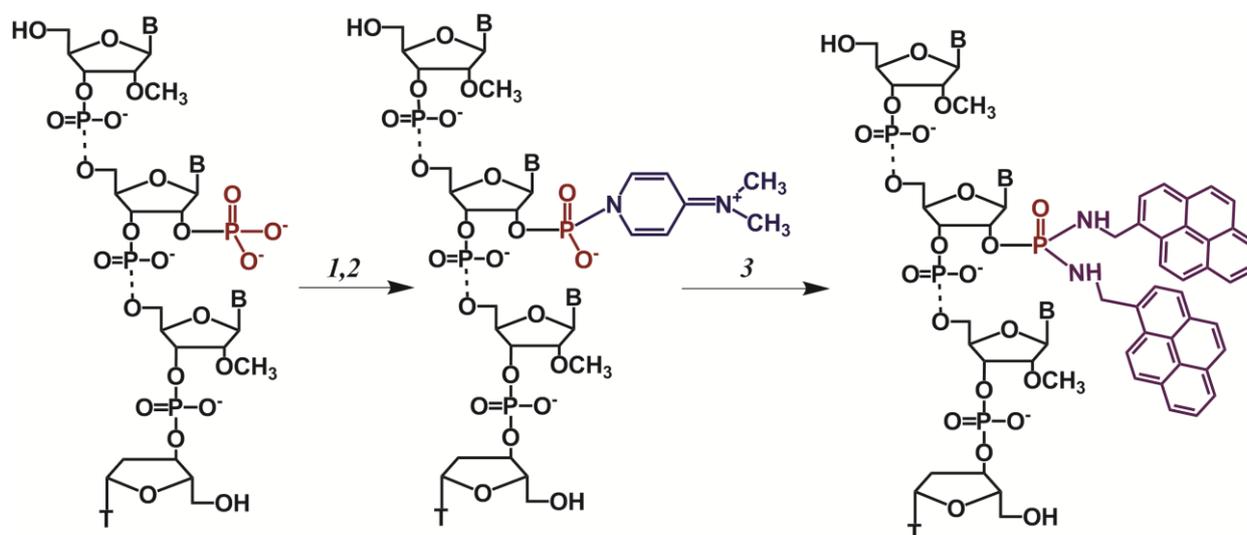
⁴По данным MALDI-TOF масс-спектрометрии.

m – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид)_{3,3}dT - «инвертированный» тимидин.

2.1.1.2. Синтез и выделение 2'-биспиренильных конъюгатов

Для введения биспиренильной группы в 2'-положение олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) нами был выбран удобный постсинтетический подход, основанный на активации фосфата в составе незащищенного олигонуклеотида (*1L1p*)-(*1L18p*), (*2L1p*)-(*2L8p*) с использованием окислительно-восстановительной пары трифенилфосфин/дипиридилдисульфид в присутствии DMAP как нуклеофильного катализатора, с последующим взаимодействием с 1-пиренилметиламином (Схема 2.5).

Схема 2.5



(1) Трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид, DMSO абс.; (2) DMAP, DMSO абс., 56 °C, 15 мин; (3) гидрохлорид 1-пиренилметиламина, (C₂H₅)₃N, DMSO абс., 56 °C, 2 ч.
В - незащищенное гетероциклическое основание, Т – тимидин.

Ранее данный метод был предложен для получения 5'-биспиренильных производных олигодезоксирибонуклеотидов и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) [18,131,229]. Так как 2'-положение является стерически затрудненным по сравнению с 5'-положением для введения двух объемных пиренильных остатков, мы модифицировали условия реакции с целью увеличения выхода 2'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов). Для этого 2'-фосфат олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (*1L1p*)-(*1L18p*), (*2L1p*)-(*2L8p*) активировали добавлением эквимольной смеси трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии DMAP в абсолютном DMSO в течение 15 мин при 56 °C, затем избыток активирующих реагентов не удаляли, а реакцию с 1-пиренилметиламином проводили в абсолютном DMSO в течение 2 ч при 56 °C. Были подобраны оптимальные условия осаждения олигонуклеотидного материала из реакционной смеси, а именно смесь раствора 2%-ного LiClO₄ в ацетоне и серного эфира (1:1).

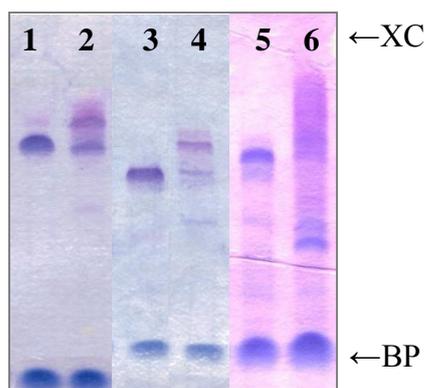


Рис. 2.3. Электрофоретический анализ реакционных смесей 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*1L3*), (*2L1*) и (*1L18*) (дорожка 2, 4 и 6, соотв.). В качестве контроля использовали выделенные гель-электрофорезом 2'-фосфорилированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (*1L3p*), (*2L1p*) и (*1L18p*) (дорожка 1, 3 и 5, соотв.). Последовательности см. Табл. 2.3.

Реакционные смеси полученных конъюгатов анализировали электрофоретически. Как и ожидалось, 2'-биспиренильные конъюгаты олигонуклеотидов обладали заметно меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с исходными фосфатсодержащими олигомерами. Увеличение количества от одного до трех объемных гидрофобных 2'-биспирен-модифицированных звеньев в цепи приводило к уширению полос соответствующих конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (Рис.2.3 и 2.4).

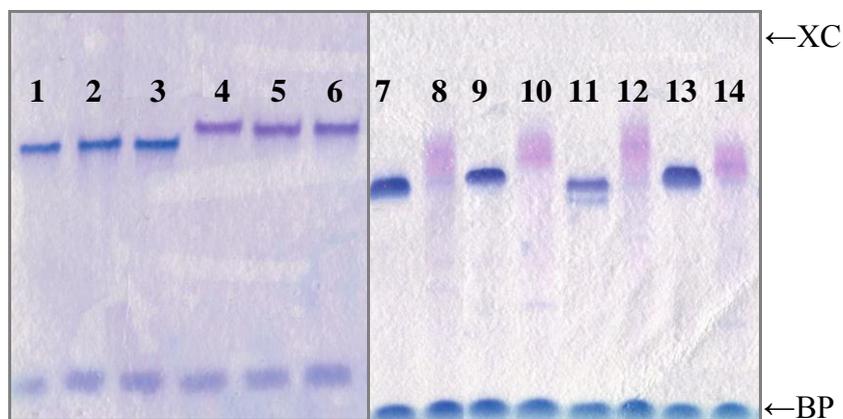


Рис. 2.4. Электрофоретический анализ выделенных гель-электрофорезом 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*1L1*), (*1L3*), (*1L5*), (*1L18*), (*1L9*), (*1L10*) и (*1L11*) (дорожки 4, 5, 6, 8, 10, 12 и 14, соотв.). В качестве контроля использовали 2'-фосфорилированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (*1L1p*), (*1L3p*), (*1L5*), (*1L18*), (*1L9*), (*1L10*) и (*1L11*) (дорожка 1, 2, 3, 7, 9, 11 и 13, соотв.). Последовательности см. Табл. 2.2. и 2.3.

Выделение 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*1L1*)-(*1L18*), (*2L1*)-(2*L8*) (Табл. 2.3) из реакционной смеси проводили препаративным гель-электрофорезом в денатурирующих условиях. Введение двух остатков пирена через 2'-фосфат резко повышает гидрофобность производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида), поэтому эффективность элюции таких производных из геля заметно меньше, чем в случае 2'-

фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов). Для повышения эффективности элюции полученных гидрофобных производных из полиакриламидного геля элюцию вели в присутствии поверхностно-активного вещества (0.1% додецилсульфат натрия, 0.3 М ацетат натрия, рН 5.2). Элюированные из геля пиренильные производные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) осаждали этанолом для удаления додецилсульфата натрия. Гомогенность полученных 2'-биспиренильных конъюгатов после выделения препаративным электрофорезом подтверждали электрофоретически (Рис. 2.4). Выходы 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*1L1*)-(1L18), (*2L1*)-(2L8) после выделения препаративным электрофорезом составили 24.4-60.5% (Табл. 2.3).

Следует отметить, что во всех случаях степень превращения исходного 2'-фосфорилированного олигонуклеотида в 2'-биспиренильный конъюгат была не менее 80%, а сравнительно невысокие выходы гидрофобных конъюгатов были связаны с потерями при их выделении из реакционной смеси.

В таблице 2.3 представлены последовательности и характеристики синтезированных пиренильных конъюгатов. Как и следовало ожидать, введение двух гидрофобных остатков пирена значительно увеличивает время удерживания конъюгатов в условиях офВЭЖХ. Введение четырех или шести пиренильных остатков резко увеличивает гидрофобность олигонуклеотида, вследствие чего конъюгат необратимо связывается с сорбентом хроматографической колонки.

Таблица 2.3. Характеристики синтезированных 2'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином

№	Последовательность, ¹ 5'-3'	Выход, ² %	Время удержи вания, ³ мин	Молекулярная масса	
				Рассчита но, m/z	Найдено, ⁴ m/z [M-H] ⁺
<i>1L1</i>	5'-m(GACC ^{BPYR} UCGCGCUCCUUGGA) _{3',3'} dT	55.0	13.1	6732.4	6732.3
<i>1L2</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCC ^{BPYR} UUGGA) _{3',3'} dT	58.8	13.0	6732.4	6734.2
<i>1L3</i>	5'-m(GACC ^{U^{BPYR}} CGCGCUCCUUGGA) _{3',3'} dT	30.8	13.0	6732.4	6734.2
<i>1L4</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCU ^{U^{BPYR}} GGA) _{3',3'} dT	53.8	13.2	6732.4	6734.2
<i>1L5</i>	5'-m(GA ^{BPYR} CCUCGCGCUCCUUGGA) _{3',3'} dT	44.6	13.0	6732.4	6734.2
<i>1L6</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCUUGGA ^{BPYR}) _{3',3'} dT	57.2	13.1	6732.4	6734.4
<i>1L7</i>	5'-m(GACCUCG ^{BPYR} CGCUCCUUGGA) _{3',3'} dT	46.9	13.2	6732.4	6733.9
<i>1L8</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCU ^{G^{BPYR}} GA) _{3',3'} dT	39.3	13.2	6732.4	6733.9
<i>2L1</i>	5'-m(GAAGUC ^{BPYR} CAGCCCCAUGGA) _{3',3'} dT	24.4	13.0	6805.1	6806.3
<i>2L2</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCC ^{C^{BPYR}} AUGGA) _{3',3'} dT	29.4	13.3	6805.1	6806.6
<i>2L3</i>	5'-m(GAAG ^{U^{BPYR}} CCAGCCCCAUGGA) _{3',3'} dT	41.5	13.4	6805.1	6806.6
<i>2L4</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCA ^{U^{BPYR}} GGA) _{3',3'} dT	49.6	13.0	6805.1	6805.6
<i>2L5</i>	5'-m(GAA ^{BPYR} GUCCAGCCCCAUGGA) _{3',3'} dT	60.5	13.4	6805.1	6804.0
<i>2L6</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCA ^{BPYR} UGGA) _{3',3'} dT	48.5	13.1	6805.1	6805.8
<i>2L7</i>	5'-m(GAA ^{G^{BPYR}} UCCAGCCCCAUGGA) _{3',3'} dT	44.1	13.3	6805.1	6806.6
<i>2L8</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCA ^{U^{BPYR}} GA) _{3',3'} dT	32.9	13.2	6805.1	6806.7
<i>1L9</i>	5'-m(GACC ^{BPYR} UCGCGCUCC ^{BPYR} UUGGA) _{3',3'} dT	22.4	-	7224.7	-
<i>1L10</i>	5'-m(GAC ^{BPYR} C ^{BPYR} UCGCGCUCCUUGGA) _{3',3'} dT	35.4	-	7224.7	7228.9
<i>1L11</i>	5'-m(GACCUCGCGCUC ^{BPYR} C ^{BPYR} UUGGA) _{3',3'} dT	32.2	-	7224.7	7223.2
<i>1L12</i>	5'-m(GACC ^{BPYR} UCGCGC ^{BPYR} UCC ^{BPYR} UUGGA) _{3',3'} dT	23.2	-	7714.1	-
<i>1L13</i>	5'-m(GACC ^{BPYR} UCGCGCUC ^{BPYR} C ^{BPYR} UUGGA) _{3',3'} dT	22.1	-	7714.1	-
<i>1L14</i>	5'-m(GACC ^{U^{BPYR}} CGCGCUCCU ^{U^{BPYR}} GGA) _{3',3'} dT	21.2	-	7224.7	-
<i>1L15</i>	5'-m(GACC ^{U^{BPYR}} C ^{BPYR} GCGCUCCUUGGA) _{3',3'} dT	25.6	-	7224.7	7229.9
<i>1L16</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCC ^{U^{BPYR}} ^{U^{BPYR}} GGA) _{3',3'} dT	25.2	-	7224.7	-
<i>1L17</i>	5'-m(GACC ^{U^{BPYR}} CGCGC ^{U^{BPYR}} CCU ^{U^{BPYR}} GGA) _{3',3'} dT	32.2	-	7714.1	-
<i>1L18</i>	5'-m(GACC ^{U^{BPYR}} CGCGCUCC ^{U^{BPYR}} ^{U^{BPYR}} GGA) _{3',3'} dT	34.2	-	7714.1	7714.3

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

²Выход после выделения препаративным гель-электрофорезом в расчете на 2'-фосфорилированный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид).

³Время удерживания 2'-биспиренильного производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (условия оФВЭЖХ см. Методики эксперимента)

⁴По данным MALDI-TOF масс-спектрометрии

Для подтверждения структуры 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), полученные образцы анализировали методом MALDI TOF-масс-спектрометрии (Табл. 2.3). На рисунке 2.5 приведены примеры полученных масс-спектров. В некоторых случаях не удалось получить хорошие масс-спектры 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих два или три 2'-биспиренилмодифицированных звена в цепи, что может быть связано с повышенной гидрофобностью этих соединений.

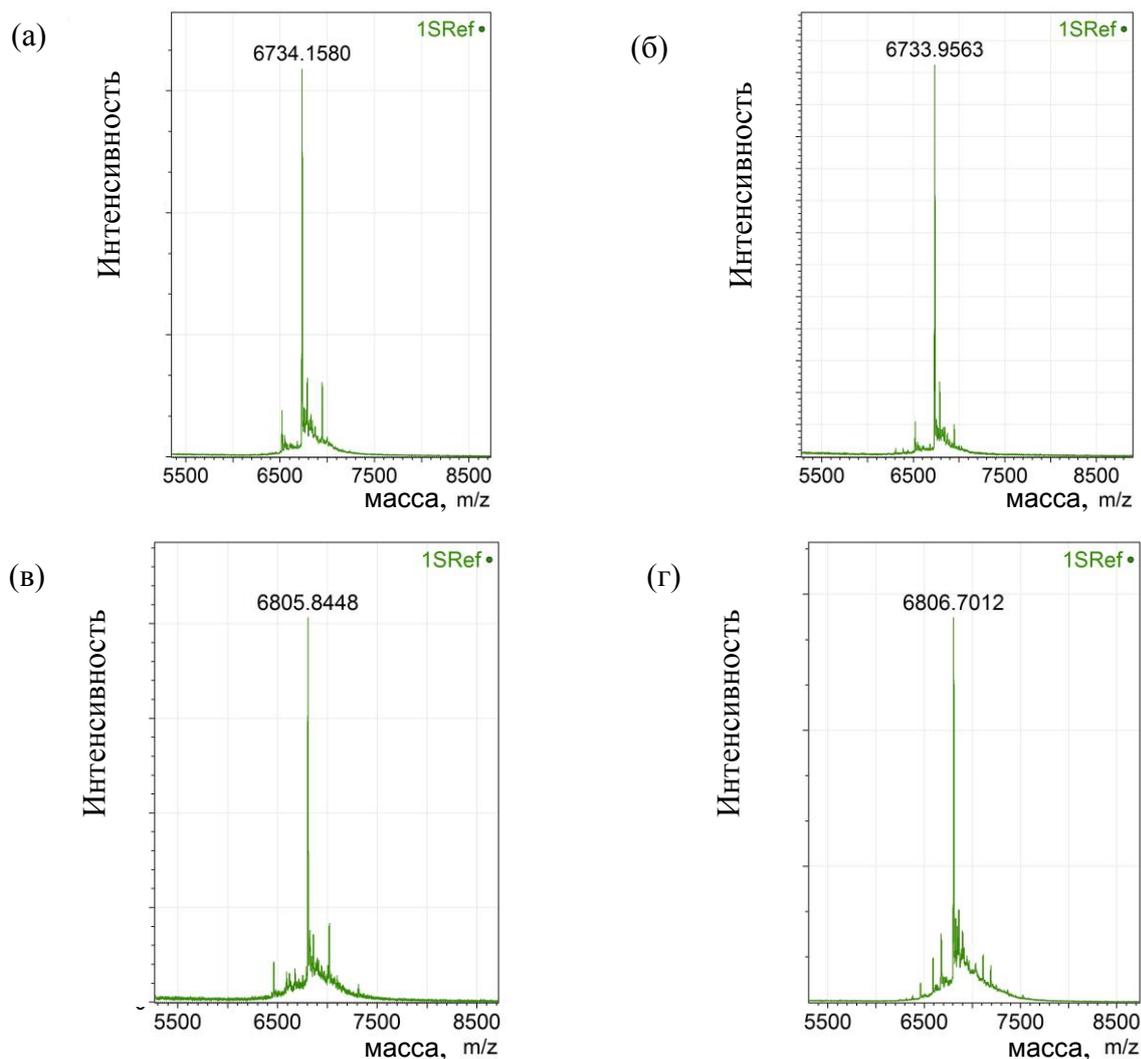


Рис. 2.5. Масс-спектры 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих 3'-концевой «инвертированный» тимидин (*1L1* (а), *1L7* (б), *2L6* (в), *2L8* (г)).

Также для подтверждения строения полученных конъюгатов были зарегистрированы их электронные спектры поглощения. На рисунке 2.6 приведены типичные спектры поглощения олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих от одного до трех 2'-биспиренилметилфосфодиамидных производных уридина. В УФ-спектрах 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) регистрировали мажорную искаженную полосу

с максимумами при 243 и 268 нм и плечом при 279 нм, соответствующую поглощению олигонуклеотидной части и коротковолновому поглощению пирена, и два характерных максимума при 333 и 349 нм, соответствующие поглощению пиренильных остатков.

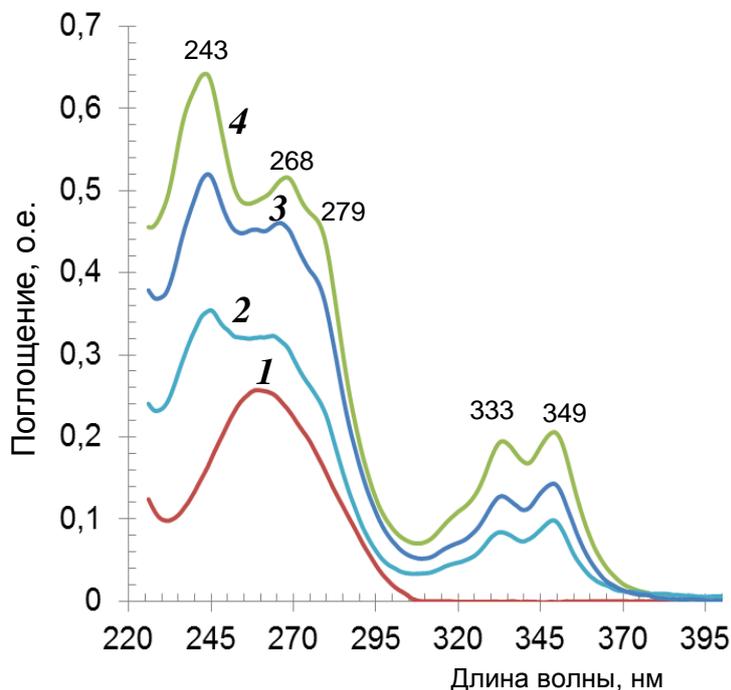


Рис. 2.6. УФ/видимые спектры поглощения 2 мкМ растворов (1) немодифицированного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) и 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих (2) один **1L3**, (3) два **1L16** или (4) три **1L18** 2'-модифицированных уридина.

С возрастанием числа пиренильных остатков в спектре поглощения увеличивается характерный максимум коротковолнового пиренового поглощения при 243 нм, значительно искажая полосу поглощения олигонуклеотидной части (Рис. 2.6). Тем не менее, количество 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) можно определять спектрофотометрически по поглощению при 260 нм, учитывая вклад поглощения пиренильных остатков ($24000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ на один остаток пирена) [230]. Соотношение поглощения при 260 и 350 нм соответствовало соотношению количеств 2'-биспиренилметилфосфодиамидных производных нуклеозидов (С, U, А или G) в цепи олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида), что подтверждает наличие предполагаемого количества пиренильных остатков в составе конъюгатов.

Таким образом, нами был предложена универсальная синтетическая стратегия, позволяющая 1) синтезировать 2'-фосфорилированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) без необходимости предварительного синтеза модифицированных нуклеотидных синтонов, 2) ввести два остатка пирена в 2'-положение нуклеотида посредством 2'-фосфата, а также 3)

получить мультипиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащие несколько 2'-биспиренильных группировок.

2.1.2. Термическая стабильность дуплексов 2'-биспиренильных зондов с РНК и ДНК

При конструировании производных олигонуклеотидов должна сохраняться способность этих соединений образовывать специфичные комплексы с НК. Поэтому нами было проведено изучение комплексообразующих свойств синтезированных конъюгатов методом термической денатурации дуплексов (совместно с к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым, ЛБМХ ИХБФМ СО РАН).

Нашей первой задачей было исследование влияния типа модификации в 2'-положении (фосфат и остатки пирена), типа нуклеотида и его положения в цепи олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) на стабильность дуплексов полученных конъюгатов с РНК- и ДНК-мишенями. В качестве модельных РНК-мишеней были использованы олигорибонуклеотиды *RNA1* (для *1L1-1L18*) и *RNA2* (для *2L1-2L8*), соответствующие фрагментам мРНК гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1* (нуклеотиды 113-137 и 315-336, соответственно). В качестве модельных ДНК-мишеней были использованы аналогичные последовательности (U->T) *DNA1* (для *1L1-1L18*) и *DNA2* (для *2L1-2L8*) (Табл. 2.4). Температуры плавления дуплексов рассчитывали с использованием модели «двух состояний» на основании величин термодинамических параметров дуплексов ΔH° и ΔS° , определяемых методом оптимизации кривых плавления, зарегистрированных на двух длинах волн (260 и 270 нм), как описано в работах [231,232].

Влияние модификации, введенной в 2'-положение *1L1-1L18* и *2L1-2L8*, оценивали по разнице температур плавления дуплексов зондов и контрольных немодифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с комплементарными короткими НК-мишенями. Данные, полученные для конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих одно 2'-биспиренилметилфосфодиамидное производное рибонуклеозида (С, U, А или G), представлены в таблице 2.4. Согласно полученным данным, термическая стабильность комплексов контрольных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *1L* и *2L* с комплементарными НК-мишенями близки по значению и очень высоки (85.4°C для *1L/RNA1*, 62.7°C для *1L/DNA1*, 85.3°C для *2L/RNA2* и 64.6°C для *2L/DNA2*). Столь высокая термостабильность дуплексов связана с большим содержанием GC-пар (12 и 11 из 18 пар нуклеотидов, соответственно). Введение фосфатной группы в 2'-положение рибозы приводит к незначительному понижению термической стабильности дуплекса, что может быть вызвано электростатическим отталкиванием вследствие введения дополнительных отрицательных зарядов. Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее на примере дуплексов олигонуклеотидов с одним 2'-фосфорилированным уридином с комплементарными НК-мишенями [222].

Таблица 2.4. Термическая стабильность дуплексов 2'-фосфатсодержащих и 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином *1L1-1L8* и *2L1-2L8* с модельными короткими РНК- и ДНК-мишенями

№	Последовательность, 5'-3'	$T_m (\Delta T_m^a), ^\circ\text{C}$			
		+RNA1		+DNA1	
<i>1L</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	85.4		62.7	
		X = 2'p	X = 2'bpyr	X = 2'p	X = 2'bpyr
<i>1L1</i>	5'-m(GACC ^X UCGCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	83.8 (-1.6)	82.5 (-2.9)	60.0 (-2.7)	61.7 (-1.0)
<i>1L2</i>	5'-m(GACCUCGCGCUC ^X UUGGA) _{3'-3'} dT	83.1 (-2.3)	83.5 (-1.9)	60.6 (-2.1)	61.6 (-1.1)
<i>1L3</i>	5'-m(GACC ^U XCGCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	82.2 (-3.2)	81.2 (-4.2)	59.4 (-3.3)	61.5 (-1.2)
<i>1L4</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCU ^U XGGA) _{3'-3'} dT	83.4 (-2.0)	82.4 (-3.0)	58.3 (-4.4)	60.1 (-2.6)
<i>1L5</i>	5'-m(GA ^X CCUCGCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	84.7 (-0.7)	83.0 (-2.4)	61.3 (-1.4)	62.6 (-0.1)
<i>1L6</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCUUGGA ^X) _{3'-3'} dT	84.8 (-0.6)	87.5 (-1.9)	61.9 (-0.8)	66.9 (+4.2)
<i>1L7</i>	5'-m(GACCUCG ^X CGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	82.8 (-2.6)	79.4 (-6.0)	60.2 (-2.5)	58.3 (-4.4)
<i>1L8</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCUUG ^X GA) _{3'-3'} dT	83.4 (-2.0)	84.5 (-0.9)	58.7 (-4.0)	63.7 (+1.0)
		+RNA2		+DNA2	
<i>2L</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCAUGGA) _{3'-3'} dT	84.3		64.6	
		X = 2'p	X = 2'bpyr	X = 2'p	X = 2'bpyr
<i>2L1</i>	5'-m(GAAGUC ^X CAGCCCCAUGGA) _{3'-3'} dT	80.1 (-4.2)	78.2 (-7.1)	59.7 (-4.9)	62.2 (-2.4)
<i>2L2</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCC ^X AUGGA) _{3'-3'} dT	82.5 (-2.8)	83.6 (-1.7)	62.3 (-4.3)	66.7 (+2.1)
<i>2L3</i>	5'-m(GAAG ^U XCCAGCCCCAUGGA) _{3'-3'} dT	81.9 (-3.4)	76.1 (-9.2)	62.0 (-2.6)	59.1 (-5.5)
<i>2L4</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCA ^U XGGA) _{3'-3'} dT	82.6 (-2.7)	82.5 (-2.8)	62.7 (-3.9)	64.9 (+0.3)
<i>2L5</i>	5'-m(GAA ^X GUCCAGCCCCAUGGA) _{3'-3'} dT	81.7 (-3.6)	80.5 (-4.8)	61.7 (-2.9)	61.4 (-3.1)
<i>2L6</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCA ^X UGGA) _{3'-3'} dT	82.2 (-3.2)	81.1 (-4.2)	61.8 (-2.8)	62.0 (-2.6)
<i>2L7</i>	5'-m(GAA ^G XUCCAGCCCCAUGGA) _{3'-3'} dT	80.0 (-5.3)	76.1 (-9.2)	61.0 (-3.6)	56.9 (-7.7)
<i>2L8</i>	5'-m(GAAGUCCAGCCCCAUG ^X GA) _{3'-3'} dT	80.8 (-4.5)	82.9 (-2.4)	62.0 (-4.6)	65.5 (+0.9)

Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.
^a ΔT_m – разница в термической стабильности дуплексов конъюгата и немодифицированного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) *1L* для *1L1-1L8* и *2L* для *2L1-2L8* с НК-мишенями. **RNA1**: 5'-r(UGCCCGUCCAAGGAGCGCGAGGUC), **DNA1**: 5'-r(TGGCCGTTCCAAGGA GCGCGAGGTC), **RNA2**: 5'-r(UCAUCCAUGGGGCUGGACUUCU), **DNA2**: 5'-d(TCATCCATGGGGCTGGACTTCT).

Как и следовало ожидать, наименьший дестабилизирующий эффект оказывало введение 2'-фосфата в нуклеозид, находящийся во втором положении от 5'- или 3'-конца олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *1L5* и *1L6*, вследствие терминальной подвижности дуплекса. Введение двух остатков пирена через 2'-фосфат в большинстве случаев приводило к увеличению термической стабильности дуплексов с модельной короткой ДНК-мишенью (кроме *1L7*, *2L3* и *2L5*) и уменьшению стабильности дуплексов с модельной короткой РНК (кроме *1L2*, *1L8*, *2L2*

и **2L4**). Этот эффект, возможно, связан с различной структурой образующихся дуплексов. Ранее авторы работы [12] исследовали ближайшее окружение остатка пирена в структуре дуплекса олигорибонуклеотида, содержащего вставку 2'-*O*-(1-пиренилметил)уридина, с комплементарной короткой РНК-мишенью (дуплекс пирен-РНК/РНК) и аналогичного дуплекса пирен-ДНК/ДНК. С использованием метода ЯМР-спектроскопии было показано, что остаток пирена вытеснен из дуплекса пирен-РНК/РНК, однако, в случае дуплекса пирен-ДНК/ДНК, остаток пирена интеркалирует внутрь дуплекса. Известно, что структура дуплекса олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид)/РНК подобна А-типу дуплекса РНК/РНК [233]; исходя из этого, мы можем предположить, что пиренильные остатки 2'-биспиренильных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) также могут быть вытеснены наружу в дуплексе с комплементарной РНК, что может приводить к уменьшению термостабильности дуплекса.

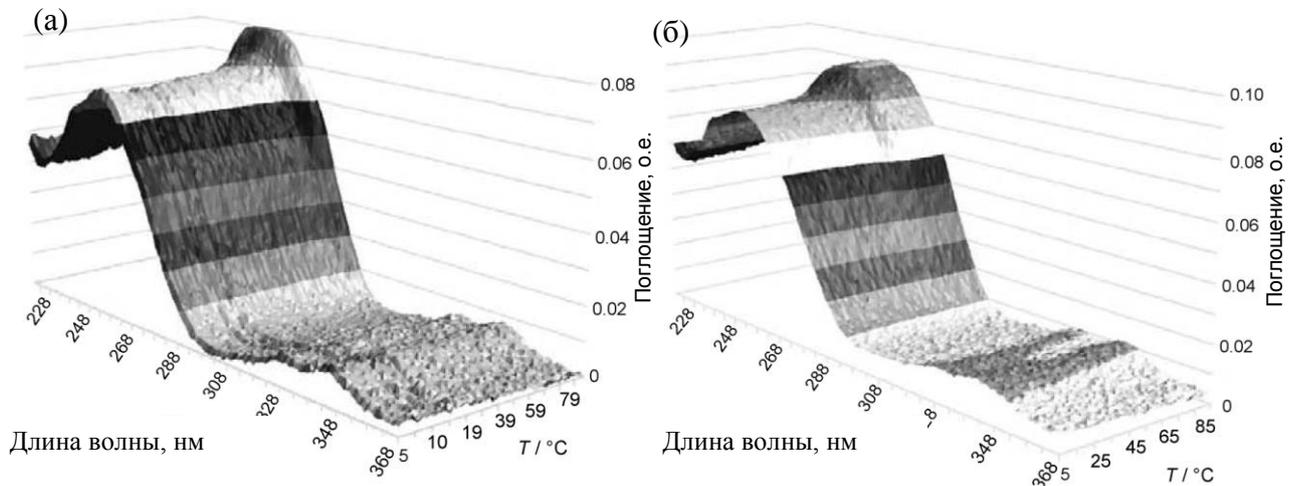


Рис. 2.7. Изменение спектров поглощения в зависимости от температуры для дуплексов 2'-биспиренильного конъюгата олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) **IL3** с модельной (а) РНК-мишенью **RNA1** и (б) ДНК-мишенью **DNA1**. Спектры были зарегистрированы при нагревании в буфере, содержащем 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, рН 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ. Последовательности НК-мишеней представлены в таблице 2.4.

Как упоминалось ранее, спектры поглощения пирена чувствительны к полярности его микроокружения, а значит, могут дать дополнительную информацию об ориентации пиренильных остатков в дуплексе с НК-мишенями [233]. Поэтому для того, чтобы попытаться подтвердить предположение о различном расположении пиренильных остатков в дуплексах полученных конъюгатов с НК-мишенями, мы исследовали изменения спектров поглощения дуплексов в диапазоне длин волн 220-370 нм при изменении температуры от 5 до 90 °C (Рис.2.7). Наиболее значительные изменения в спектрах, как и ожидалось, были зарегистрированы при 260 нм и соответствовали плавлению дуплекса, при этом изменений в диапазоне поглощения пирена (при 340 нм) не наблюдали.

Наибольшую дестабилизацию дуплекса с модельной РНК наблюдали при введении 2'-биспиренильного нуклеозида в середину олигонуклеотидной цепи: в случае зондов *IL3*, *IL7*, *2L1*, *2L3*, *2L5*, *2L6* и *2L7* разница температур плавления составляла -4.2-9.2 °С. Можно предположить, что такая значительная дестабилизация связана с потерей некоторых водородных связей в дуплексе вследствие стерических затруднений, вызванных введением громоздких гидрофобных пиренильных групп, которые стремятся разместиться вне плотного дуплекса А-типа. В случае же дуплексов 2'-биспиренильных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с ДНК-мишенями остатки пирена, очевидно, интеркалируют в дуплекс, стабилизируя его (мы наблюдали значительное увеличение температуры плавления дуплексов вплоть до 6.4 °С). Из полученных данных можно сделать вывод о том, что два остатка пирена, введённых посредством одного 2'-фосфата в олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид), оказывают различный эффект на термическую стабильность дуплексов зондов с модельными РНК- и ДНК-мишенями.

Таблица 2.5. Термическая стабильность дуплексов 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *IL9-IL18*, содержащих 3'-концевой «инвертированный» тимидин, с модельными короткими РНК- и ДНК-мишенями

№	Последовательность ¹ , 5'-3'	+RNAI		+DNAI	
		T _m , °C	ΔT _m /мод., °C ²	T _m , °C	ΔT _m /мод., °C ²
<i>IL9</i>	5'-m(GACC ^{BPYR} UCGCGCUCC ^{BPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	79.5	-3.0	59.8	-1.1
<i>IL10</i>	5'-m(GAC ^{BPYR} C ^{BPYR} UCGCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	81.7	-1.9	61.2	-0.8
<i>IL11</i>	5'-m(GACCUCGCGCUC ^{BPYR} C ^{BPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	80.7	-2.3	60.4	-0.8
<i>IL12</i>	5'-m(GACC ^{BPYR} UCGCGC ^{BPYR} UCC ^{BPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	67.8	-5.9	54.8	-2.4
<i>IL13</i>	5'-m(GACC ^{BPYR} UCGCGCUC ^{BPYR} C ^{BPYR} UUGGA) _{3'-3'} dT	68.0	-5.8	55.4	-2.2
<i>IL14</i>	5'-m(GACCU ^{BPYR} CGCGCUCCU ^{BPYR} GGA) _{3'-3'} dT	77.9	-3.8	61.8	-0.1
<i>IL15</i>	5'-m(GACCU ^{BPYR} C ^{BPYR} GCGCUCCUUGGA) _{3'-3'} dT	-	-	-	-
<i>IL16</i>	5'-m(GACCUCGCGCUCCU ^{BPYR} U ^{BPYR} GGA) _{3'-3'} dT	87.1	+0.9	65.9	+2.0
<i>IL17</i>	5'-m(GACCU ^{BPYR} CGCGCU ^{BPYR} CCU ^{BPYR} GGA) _{3'-3'} dT	67.4	-6.0	60.0	-0.7
<i>IL18</i>	5'-m(GACCU ^{BPYR} CGCGCUCCU ^{BPYR} U ^{BPYR} GGA) _{3'-3'} dT	75.2	-3.4	55.1	-2.3

Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов - 200 нМ.

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

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

Последовательности НК-мишеней представлены в таблице 2.4.

На следующем этапе работы нами была исследована термическая стабильность дуплексов 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **1L9-1L18**, содержащих две или три вставки 2'-биспиренилметилфосфодиамидных производных U или C (Табл. 2.5). Введение в состав олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) двух или трех модифицированных нуклеозидов приводило к значительной дестабилизации дуплексов с РНК-или ДНК-мишенью (кроме **1L16**), причем в случае дуплексов с РНК-мишенью этот эффект был наиболее выражен.

Было показано, что введение двух модифицированных нуклеозидов в соседствующие положения в меньшей степени дестабилизирует дуплексы зондов с НК-мишенями (для конъюгатов **1L10**, **1L11**, **1L15** и **1L16** ΔT_m в расчете на модификацию составляла от +0.9 до -2.3 °C), по сравнению с введением модифицированных нуклеозидов в отдаленные друг от друга положения олигонуклеотидной цепи (для конъюгатов **1L9** и **1L14** ΔT_m в расчете на модификацию была -3.0-3.8 °C). Введение трех гидрофобных модификаций в олигонуклеотидную цепь резко уменьшало термическую стабильность дуплексов конъюгатов с НК-мишенями, причем наибольшая дестабилизация дуплексов была в случае конъюгатов, модифицированных нуклеозиды в которых находились в середине цепи (ΔT_m в расчете на модификацию достигала -6.0 °C). Тем не менее, как видно из данных, представленных в таблицах 2.4 и 2.5, в данных условиях все полученные в работе 2'-биспиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метирибонуклеотидов) образуют достаточно стабильные дуплексы с соответствующими НК-мишенями.

2.1.3. Биологические и физико-химические свойства линейных зондов

Важнейшими требованиями, предъявляемыми к олигонуклеотидным конструкциям, являются устойчивость к действию различного рода нуклеаз, а также способность образовывать стабильные и специфичные комплексы с комплементарными НК. Следующим этапом нашей работы было изучение биологических и физико-химических свойств синтезированных зондов.

2.1.3.1. Устойчивость линейных 2'-биспиренильных зондов к нуклеолитической деградации

Известно, что основным путем деградации олигонуклеотидов нуклеазами является 3'-экзонуклеазное расщепление [234]. В связи с этим, для повышения устойчивости олигонуклеотидных конструкций было предложено использовать олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), содержащие модификацию на 3'-конце. Одной из наиболее удачных модификаций является введение 3'-концевого «инвертированного» тимидина [223].

Устойчивость синтезированных 2'-биспиренильных зондов к действию нуклеаз исследовали с использованием 5'-[³²P]-мечения. Интересно отметить, что в случае олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином введение радиоактивной метки с помощью полинуклеотидкиназы Т4 может идти по обоим 5'-гидроксилам, при этом образуется смесь трех продуктов, два из которых содержат одну радиоактивно меченую фосфатную группу и их электрофоретическая подвижность совпадает, а третий продукт содержит два радиоактивно меченых фосфата и обладает большей электрофоретической подвижностью (Рис.2.8).

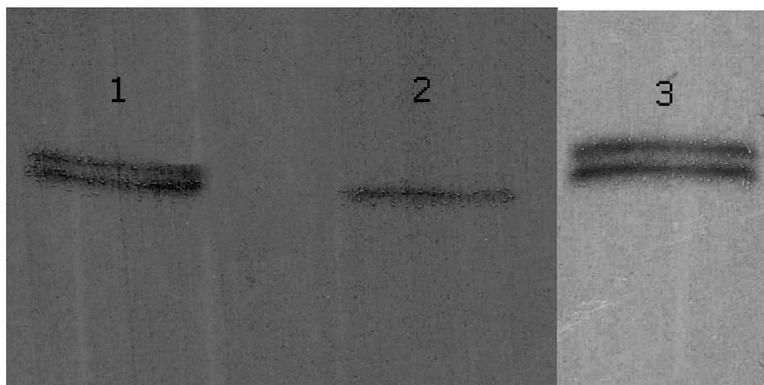


Рис.2.8. Радиоавтографы реакционных смесей после реакции кинирования олигонуклеотидов *1L*, *1L0* и *1L3* (дорожки 1-3, соотв.).

Исследование устойчивости 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином *1L3*, *1L14*, *1L17* в сравнении с контрольным олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидом), содержащим или не содержащим 3'-концевой «инвертированный» тимидином (*1L* и *1L0*, соответственно), проводили в культуральной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Пробы отбирали через определенные интервалы времени и анализировали методом электрофоретического разделения в денатурирующих условиях с последующей автордиографией (Рис. 2.9).

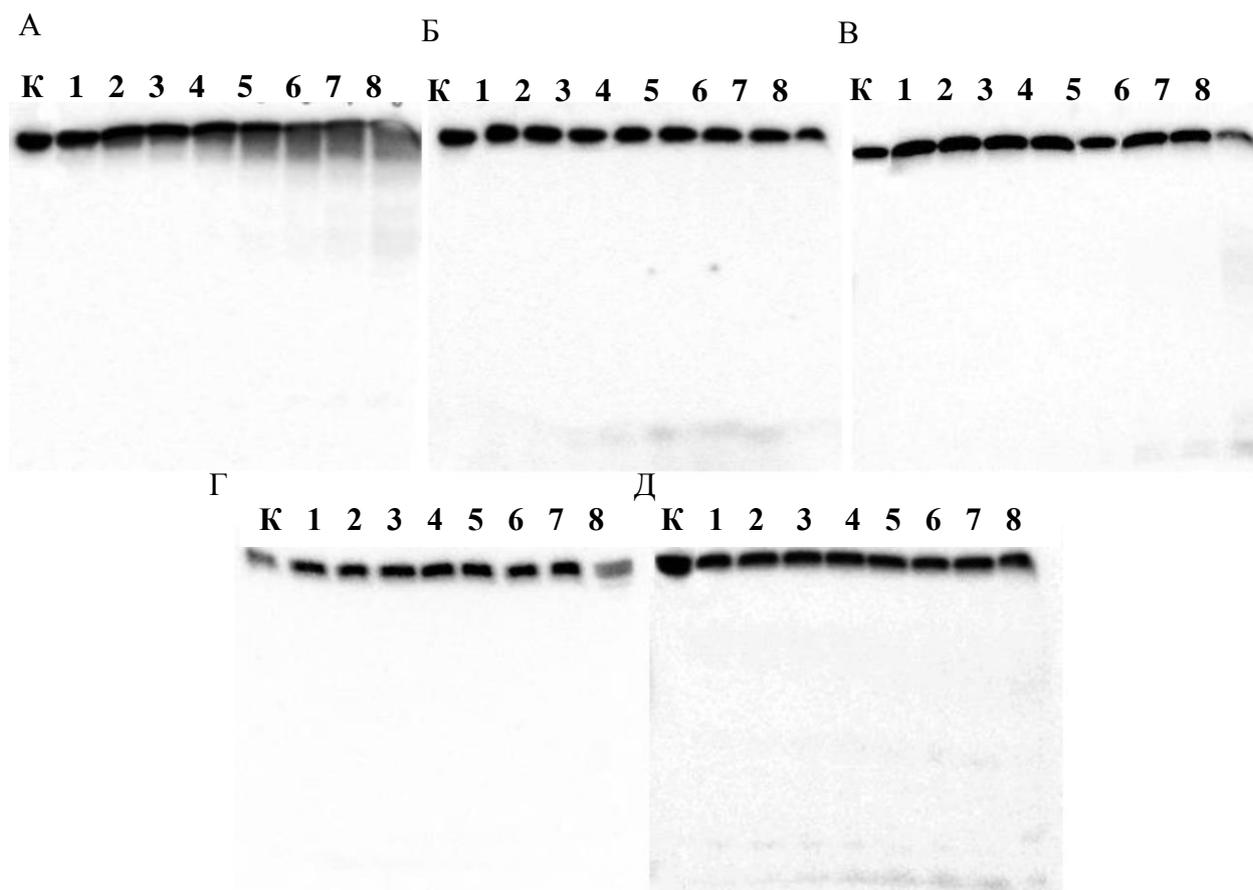


Рис. 2.9. Электрофоретический анализ 5'-[³²P]-меченых олигонуклеотидов *IL0* (панель А), *IL* (панель Б), *IL3* (панель В), *IL14* (панель Г), *IL17* (панель Д), инкубированных при 37 °С в культуральной среде IMDM, содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку; время инкубации 5, 10, 30, 60, 120, 180, 360 мин, 1 сут (дорожки 1-8 соответственно); К - исходный олигонуклеотид.

На радиоавтографах видно, что интенсивность излучения 5'-[³²P]-меченого олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) *IL0* начинает падать уже через 10 мин инкубации с сывороткой. Контрольный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид) *IL*, а также все 2'-биспиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с 3'-концевым «инвертированным» тимидином *IL3*, *IL14* и *IL17* не подвергались деградации нуклеазами сыворотки, что является существенным преимуществом при использовании их в клеточной среде.

2.1.3.2. Сравнительное исследование спектральных свойств 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и чувствительности их флуоресценции к образованию дуплексов с ДНК- и РНК-мишенями

Следующей задачей было сравнительное исследование спектров испускания флуоресценции 2'-биспиренильных зондов (*IL1-IL18*, *2L1-2L8*) и их дуплексов с короткими РНК- и ДНК-мишенями (*RNA1*, *RNA2*, *DNA1* и *DNA2*, соответственно), а также с протяженным 678-звенным 5'-концевым фрагментом PGY1/MDR1 мРНК (*RNA3*) с известной вторичной

структурой [220]. На рисунках 2.10 и 2.11 представлены некоторые примеры полученных спектров флуоресценции. В спектрах 2'-биспиренильных конъюгатов наблюдали два хорошо структурированных пика с максимумами при 378 и 391 нм, соответствующих колебательным полосам I и III мономера пирена и, в некоторых случаях, широкую неструктурированную полосу флуоресценции пиренового эксимера при 460-510 нм (см., например, [11,15,16]). Мы обнаружили, что отношение интенсивности флуоресценции полос III/I было относительно высоким в спектрах всех полученных конъюгатов, что свидетельствует о локальном гидрофобном окружении пиренильных остатков, то есть о взаимодействии пиренильных остатков с соседними азотистыми основаниями (Табл. 2.6).

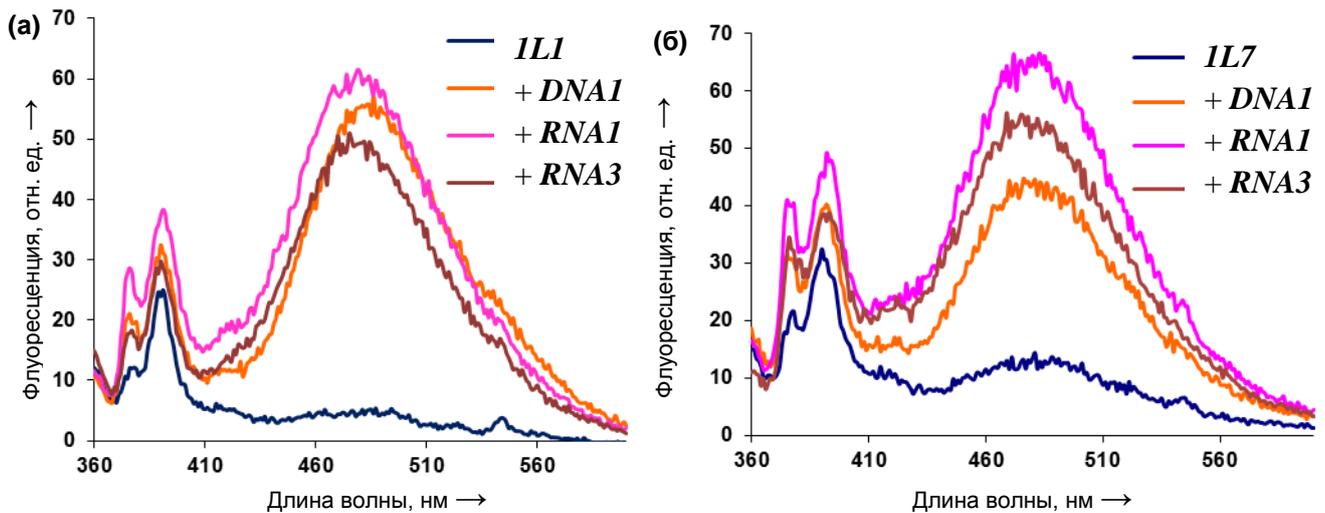


Рис. 2.10. Спектры испускания флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов *1L1* (а), *1L7* (б) и их дуплексов с НК-мишенями. Спектры записаны при 25 °С и длине волны возбуждения флуоресценции 345 нм в буфере 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 100 нМ. *RNA1*: 5'-r(UGGCCGUUCCAAGGAGCGCGAGGUC), *DNA1*:5'-r(TGGCCGTTCCAAGGA GCGCGAGGTC).

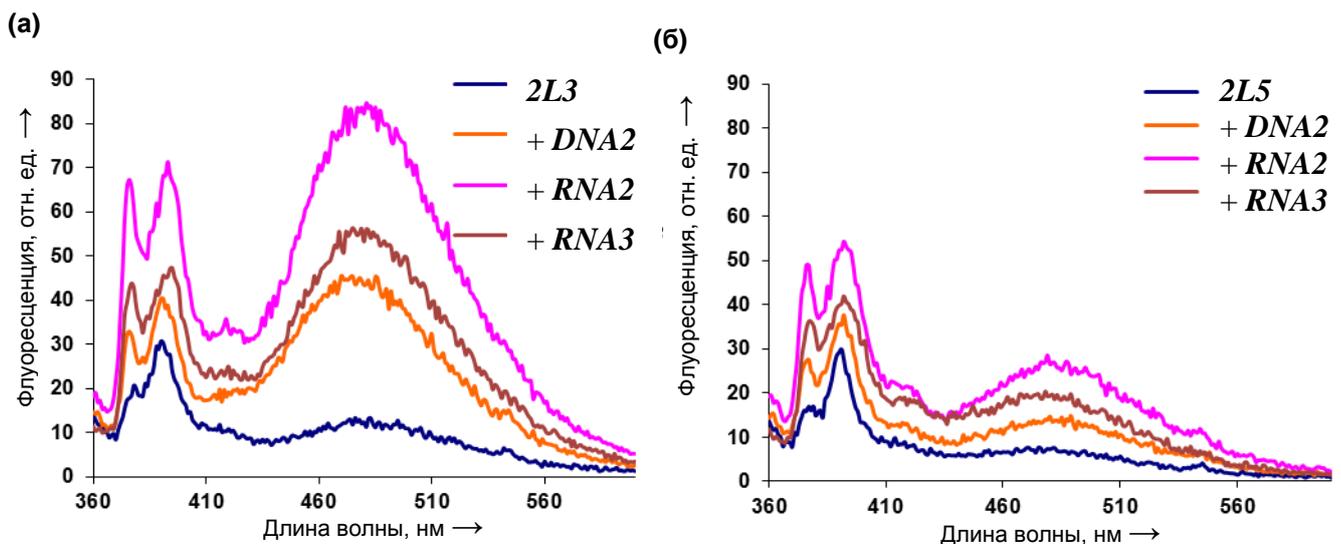


Рис. 2.11. Спектры испускания флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов *1L1* (а), *1L7* (б), *2L3* (в) и *2L5* (г) и их дуплексов с соответствующими НК-мишенями. Условия см. рисунок 2.10. *RNA2*: 5'-r(UCAUCCAUGGGGCGUGGACUUCU), *DNA2*: 5'-d(TCATCCATGGGGCTGGACTTCCT).

При гибридизации 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих один 2'-модифицированный нуклеозид (*1L1-1L8*, *2L1-2L8*), с короткими ДНК-мишенями (*DNA1* или *DNA2*) в большинстве случаев наблюдали небольшое увеличение мономерной флуоресценции пирена (Рис. 2.10 и 2.11). В то же время эксимерная флуоресценция пирена уменьшалась в случае зондов *2L4* и *2L8* и резко увеличивалась в случае зондов *1L1*, *1L7*, *2L3* и *2L7*. При гибридизации этих зондов с короткими РНК-мишенями в большинстве случаев наблюдали увеличение мономерной флуоресценции пирена, а в случае зондов *1L1*, *1L3*, *1L5*, *1L7*, *2L3* и *2L7* – многократное увеличение интенсивности пиренильной эксимерной флуоресценции (до 21 раза) (Рис. 2.12).

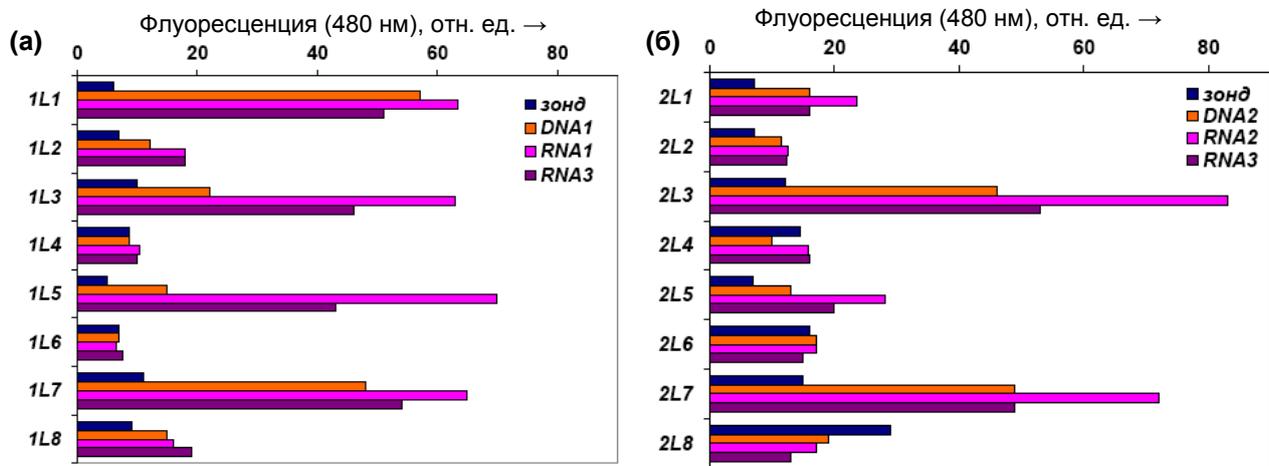


Рис. 2.12. Интенсивности эксимерной флуоресценции (480 нм) 2'-биспиренильных зондов (а) *1L1-1L8* и (б) *2L1-2L8* и их дуплексов с соответствующими НК-мишенями. Условия см. рисунок 2.10. *RNA1*: 5'-r(UGGCCGUUCCAAGGAGCGCGAGGUC), *DNA1*:5'-r(TGGCCGTTCCAAGGAGCGCGAGGTC), *RNA2*: 5'-r(UCAUCCAUGGGGCUGGACUCCU), *DNA2*: 5'-d(TCATCCATGGGGCTGGACTTCCT).

Мы проанализировали влияние локального нуклеотидного окружения остатков пирена на их способность образовывать эксимер. Было обнаружено, что поведение спектров флуоресценции не зависит от природы модифицированного нуклеотида. Например, в случае идентичных комбинаций тринуклеотидов (по одному нуклеотиду с 5'- и 3'-стороны от 2'-модифицированного нуклеотида, NXN) мы наблюдали различный отклик флуоресценции зондов на присутствие НК-мишени. Затем мы анализировали влияние пары нуклеотидов с 5'- и 3'-стороны от 2'-модифицированного нуклеотида (тринуклеотиды NNX и XNN, соответственно). Оказалось, что природа пары нуклеотидов с 5'-стороны от модифицированного нуклеотида не влияет на сигнал, а пара нуклеотидов с 5'-стороны, напротив, играет ключевую роль, при этом оптимальными парами с 3'-стороны являются CC, CG и UC. При связывании зондов с РНК-мишенями соотношение интенсивностей флуоресценции полос III/I уменьшалось, что свидетельствует о том, что остатки пирена

находятся в более полярном окружении вне дуплекса (Табл. 2.6) [17]. При связывании зондов с протяженной 678-звенной РНК-мишенью **RNA3** мы регистрировали подобные флуоресцентные спектры, однако, как и ожидалось, интенсивность эксимерной флуоресценции была ниже (Рис. 2.11 и Рис. 2.12). Добавление некомплементарных мишеней к 2'-биспиренильным пробам не вызывает никаких изменений в спектрах испускания зондов (спектры не показаны).

Таблица 2.6. Интенсивности флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и их дуплексов с НК-мишенями

№	$I_{378 \text{ нм}}^a$	$I_{391 \text{ нм}}^b$	$I_{391 \text{ нм}}/I_{378 \text{ нм}}^c$	№	$I_{378 \text{ нм}}^a$	$I_{391 \text{ нм}}^b$	$I_{391 \text{ нм}}/I_{378 \text{ нм}}^c$
1L1	13.7	26.8	1.96	2L1	11.5	20.1	1.75
+ DNA1	22.9	34.3	1.50	+ DNA2	19.7	26.5	1.35
+ RNA1	30.5	39.5	1.30	+ RNA2	38.2	41.6	1.09
1L2	15.4	27.5	1.79	2L2	13.5	21.4	1.59
+ DNA1	33.6	44.7	1.33	+ DNA2	27.6	31.7	1.15
+ RNA1	34.7	41.3	1.19	+ RNA2	53.3	56.2	1.05
1L3	12.6	24.9	1.98	2L3	20.7	30.3	1.46
+ DNA1	20.4	33.5	1.64	+ DNA2	29.9	40.3	1.35
+ RNA1	58	63.4	1.09	+ RNA2	60.72	68.2	1.12
1L4	14.7	24.7	1.68	2L4	14.8	23.8	1.61
+ DNA1	23.6	32.1	1.36	+ DNA2	26	30.3	1.17
+ RNA1	40.2	46.4	1.15	+ RNA2	59.2	60.5	1.02
1L5	16.8	28.2	1.68	2L5	16.1	29.9	1.86
+ DNA1	32.4	42.1	1.30	+ DNA2	25	35.5	1.42
+ RNA1	49.4	52.5	1.06	+ RNA2	44.6	52.5	1.18
1L6	14.2	27.4	1.93	2L6	29.2	39.2	1.34
+ DNA1	35	44.3	1.27	+ DNA2	33.7	41	1.22
+ RNA1	50.9	56.3	1.11	+ RNA2	49.9	58.7	1.18
1L7	21.6	30.6	1.42	2L7	20.3	31.7	1.56
+ DNA1	30	39.5	1.32	+ DNA2	32.2	42.2	1.31
+ RNA1	40.4	45	1.11	+ RNA2	49	57.4	1.17
1L8	19.5	31.7	1.63	2L8	28.8	39.1	1.36
+ DNA1	35.8	45.5	1.27	+ DNA2	36.9	45.4	1.23
+ RNA1	46.9	55.1	1.17	+ RNA2	47.4	54.7	1.15

Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂EDTA; концентрация олигонуклеотидов – 100 нМ. ^a Интенсивность флуоресценции на длине волны 378 нм (полоса I). ^b Интенсивность флуоресценции на длине волны 391 нм (полоса III). ^c Соотношение интенсивностей флуоресценции полос III/I. Последовательности НК-мишеней представлены на рисунке 2.12.

Затем мы определили квантовые выходы флуоресценции (Φ_F) полученных 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и их дуплексов с короткой РНК-мишенью. Расчет квантовых выходов проводили относительно антрацена в циклогексане ($\Phi_F = 0.36$) и 9,10-дифенилантрацена в циклогексане ($\Phi_F = 1.00$) как описано в [235]. Так как

данные пробы планируется в дальнейшем использовать для детекции РНК-мишеней в присутствии кислорода воздуха, образцы не дегазировали.

Таблица 2.7. Квантовые выходы испускания флуоресценции (Φ_F , $T = 25$ °C) 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и их дуплексов с НК-мишенями

#	Φ_F , %		#	Φ_F , %	
	зонд	+ <i>RNA1</i>		зонд	+ <i>RNA2</i>
<i>1L1</i>	3.3	9.3	<i>1L1</i>	7.2	9.2
<i>1L2</i>	2.2	2.9	<i>1L2</i>	8.1	7.3
<i>1L3</i>	3.2	6.4	<i>1L3</i>	5.5	9.2
<i>1L4</i>	5.5	4.7	<i>1L4</i>	7.7	6.6
<i>1L5</i>	5.6	8.6	<i>1L5</i>	8.0	6.7
<i>1L6</i>	3.2	3.6	<i>1L6</i>	6.1	5.2
<i>1L7</i>	4.1	9.5	<i>1L7</i>	6.3	10.8
<i>1L8</i>	5.2	4.3	<i>1L8</i>	4.2	2.8

Последовательности НК-мишеней представлены на рисунке 2.12.

Квантовые выходы флуоресценции одноцепочечных 2'-биспиренильных зондов *1L1-1L8*, *2L1-2L8* были в диапазоне 2.2-8.1 % (Табл. 2.7), что является типичными значениями для пиренильных производных олигонуклеотидов. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными работами [8,22], а также с полученными соотношениями интенсивностей флуоресценции полос III/I (см. выше). Можно заключить, что зонд имеет такую вторичную структуру, при которой пиренильные остатки в зонде взаимодействуют с азотистыми основаниями, в результате происходит эффективное тушение флуоресценции пирена. При этом квантовые выходы флуоресценции дуплексов этих зондов были в диапазоне 2.9-10.8 %. Как и ожидалось, квантовые выходы флуоресценции зондов, наиболее чувствительных к РНК-мишени, значительно увеличивались. Вероятно, при связывании зонда с НК-мишенью объемные гидрофобные пиренильные остатки, введенные в 2'-положение через фосфат, ориентированы в сторону малой бороздки и частично вытеснены из НК-дуплекса. В пользу такого предположения свидетельствуют полученные данные о термостабильности этих дуплексов, а также наблюдения о влиянии природы пары нуклеотидов с 3'-стороны от модификации.

В спектрах испускания флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *1L9-1L18*, содержащих две или три вставки 2'-

биспиренилметилфосфодиамидных производных U или C, наблюдали увеличение эксимерной флуоресценции с ростом числа 2'-биспиренильных группировок. При этом для зондов с одинаковым количеством флуорофорных групп, но с различным их расположением спектры флуоресценции также значительно отличались, что может быть связано с чувствительностью пирена к его ближайшему окружению, а именно к нуклеотидному контексту.

Мы ожидали, что при увеличении количества пиренильных остатков в составе зонда изменения в спектрах флуоресценции зондов при связывании с РНК-мишенью будут выражены сильнее, а значит, возрастет чувствительность зондов (соотношение сигнал/шум). Однако, при гибридизации 2'-биспиренильных конъюгатов *IL9-IL18* с модельными комплементарными НК-мишенями интенсивность эксимерной флуоресценции в спектрах была сопоставима с той, что мы регистрировали в случае зондов *IL1-IL8* и *2L1-2L8*. При гибридизации зондов *IL10* и *IL15*, содержащих два 2'-модифицированных нуклеотида подряд, с НК-мишенью (*DNA1*, *RNA1* или *RNA3*) наблюдали наибольшее увеличение интенсивности эксимерной флуоресценции (Рис. 2.13).

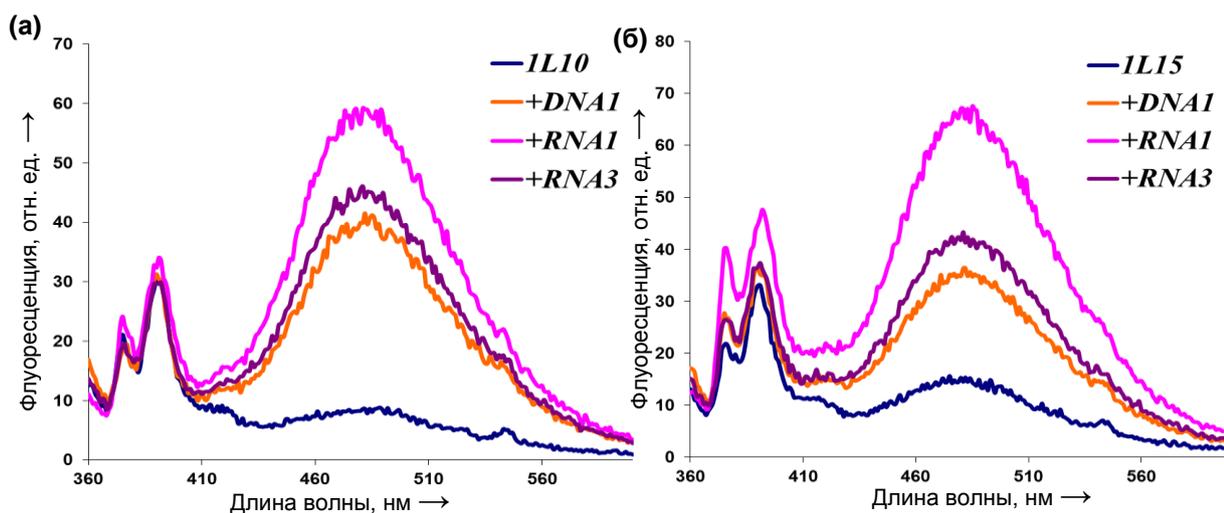


Рис. 2.13. Спектры испускания флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов *IL10* (а), *IL15* (б) и их дуплексов с НК-мишенями. Спектры записаны при 25 °С и длине волны возбуждения флуоресценции 345 нм в буфере 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, рН 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 100 нМ. Последовательности НК-мишеней представлены на рисунке 2.12.

Как и следовало ожидать, в случае зондов *IL12*, *IL14*, *IL17* и *IL18*, характеризующихся удаленным друг от друга расположением 2'-модифицированных нуклеотидов, были зарегистрированы общие тенденции: добавление ДНК-мишени *DNA1* практически не повлияло на интенсивность мономерной флуоресценции, но привело к снижению интенсивности эксимерной флуоресценции, в то время как в присутствии РНК-мишени *RNA1* происходило увеличение как мономерной, так и эксимерной флуоресценции пирена (Рис. 2.14).

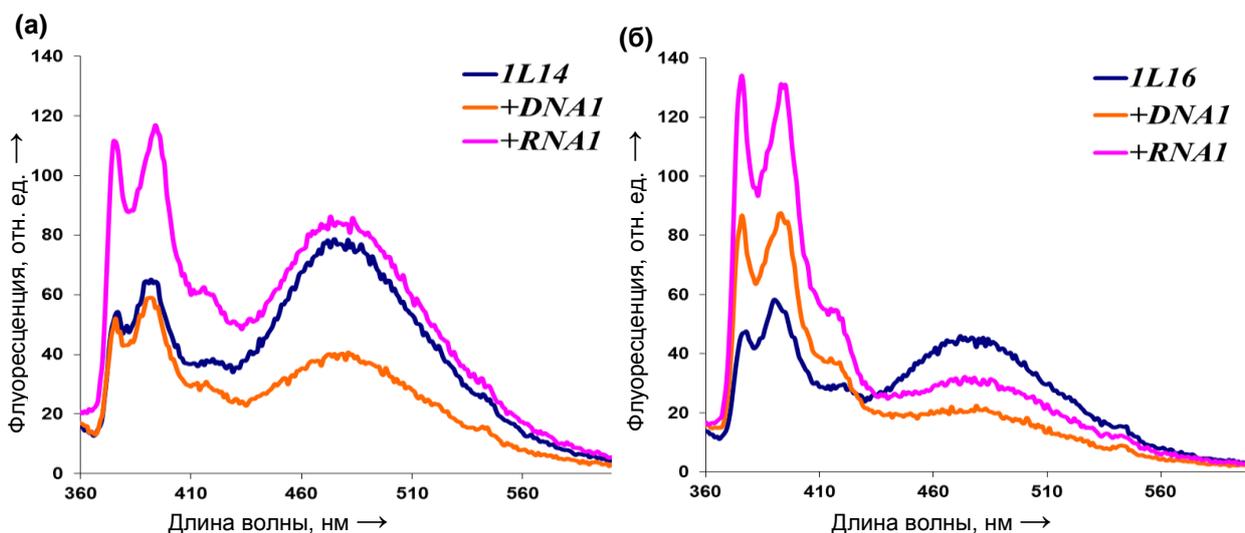


Рис. 2.14. Спектры испускания флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов *IL14* (а), *IL16* (б) и их дуплексов с НК-мишенями. Последовательности НК-мишеней представлены на рисунке 2.12.

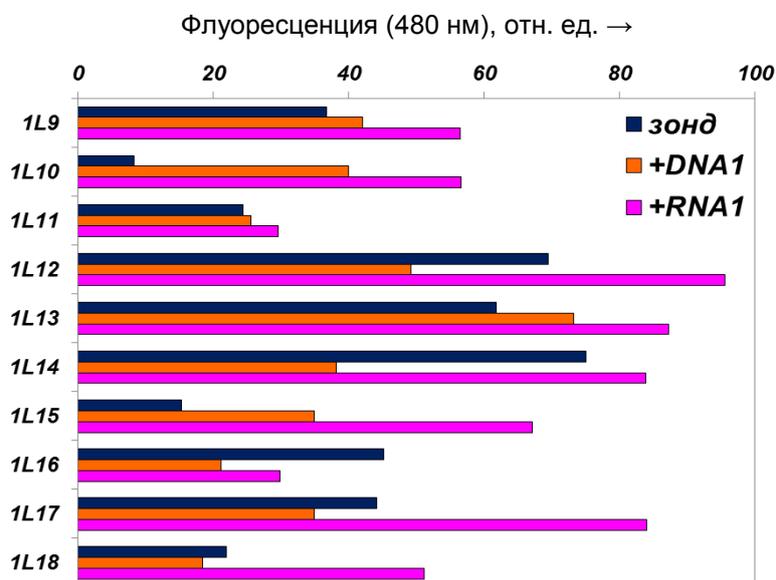


Рис. 2.15. Интенсивности эксимерной флуоресценции (480 нм) 2'-биспиренильных конъюгатов *IL9-IL18* и их дуплексов с соответствующими НК-мишенями. Последовательности НК-мишеней представлены на рисунке 2.12.

При гибридизации зонда *IL16*, содержащего два соседствующих 2'-модифицированных уридина, с ДНК-мишенью *DNA1* наблюдали незначительное увеличение мономерной флуоресценции и уменьшение эксимерной флуоресценции, в то время как в присутствии РНК-мишени *RNA1* происходило значительное возрастание мономерной флуоресценции и менее выраженное падение интенсивности эксимерной флуоресценции. Стоит отметить, что, как и в случае зондов *IL1-IL8*, *2L1-2L8*, при гибридизации зондов *IL9-IL18* с НК-мишенями соотношение интенсивностей полос Ш/Л уменьшалось.

На рисунке 2.15 представлена диаграмма интенсивностей эксимерной флуоресценции 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *IL9-IL18*, содержащих две

или три вставки модифицированных нуклеотидов и, соответственно, 4 или 6 остатков пирена, и их дуплексов с НК-мишенями (*DNA1* или *RNA1*). Видно, что исходная интенсивность эксимерной флуоресценции высока (кроме зондов *1L10* и *1L15*), при этом соотношение сигнал/шум, а значит и чувствительность полученных зондов оказались ниже, чем в случае зондов *1L1-1L8*, *2L1-2L8*, содержащих одну вставку, то есть всего два остатка пирена.

Суммируя полученные результаты, можно сделать предположение о структуре образующихся дуплексов 2'-биспиренильных зондов с НК-мишенями. Исходя из соотношений интенсивностей полос III/I мономерной флуоресценции пиренильных остатков, можно заключить, что полярность окружения пиренильных остатков возрастает в ряду зонд < дуплекс (зонд-ДНК-мишень) < дуплекс (зонд-РНК-мишень). Вероятно, дуплексы зондов с РНК-мишенью, подобно дуплексам А-формы, более компактные, по сравнению с дуплексами зондов с ДНК-мишенью, и остатки пирена вытеснены из НК-дуплекса. Более того, нам удалось установить, что в случае зондов *1L1-1L8*, *2L1-2L8* с одним 2'-модифицированным нуклеозидом в цепи природа пары нуклеотидов с 3'-стороны от модифицированного звена влияет на способность пиренильных остатков образовывать эксимер.

2.1.3.3. Исследование связывания 2'-биспиренильных зондов с НК-мишенями методом флуориметрического титрования

Следующим шагом в работе было исследование процесса гибридизации наиболее чувствительных 2'-биспиренильных зондов с НК-мишенями. Изучение гибридизационных свойств этих зондов проводили методом флуориметрического титрования, основанным на изменении интенсивности флуоресценции пиренильных зондов при образовании комплексов с модельной НК. Для этого были записаны спектры испускания флуоресценции дуплексов 2'-биспиренильных зондов *1L1*, *1L3*, *1L5*, *1L7*, *1L10*, *1L15*, *2L1* и *2L7* (концентрация $1 \cdot 10^{-7}$ М) с НК-мишенями (*DNA1* или *DNA2*, *RNA1* или *RNA2*, *RNA3*) в буфере, содержащем 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 1 мМ Na₂ЭДТА при температуре 25 °С. Так как лимитирующей стадией гибридизации зондов со структурированной РНК-мишенью является разрушение вторичной структуры мишени, после добавления НК-мишени смесь инкубировали до прекращения изменения спектров флуоресценции. Связывание 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с НК-мишенью, добавляемой в повышающихся концентрациях, приводило к характерным изменениям мономерной и эксимерной флуоресценции зондов. Ниже представлены типичные зависимости изменения эксимерной флуоресценции от концентрации НК-мишени, полученные при титровании 2'-биспиренильных зондов соответствующей комплементарной НК-мишенью (Рис. 2.16).

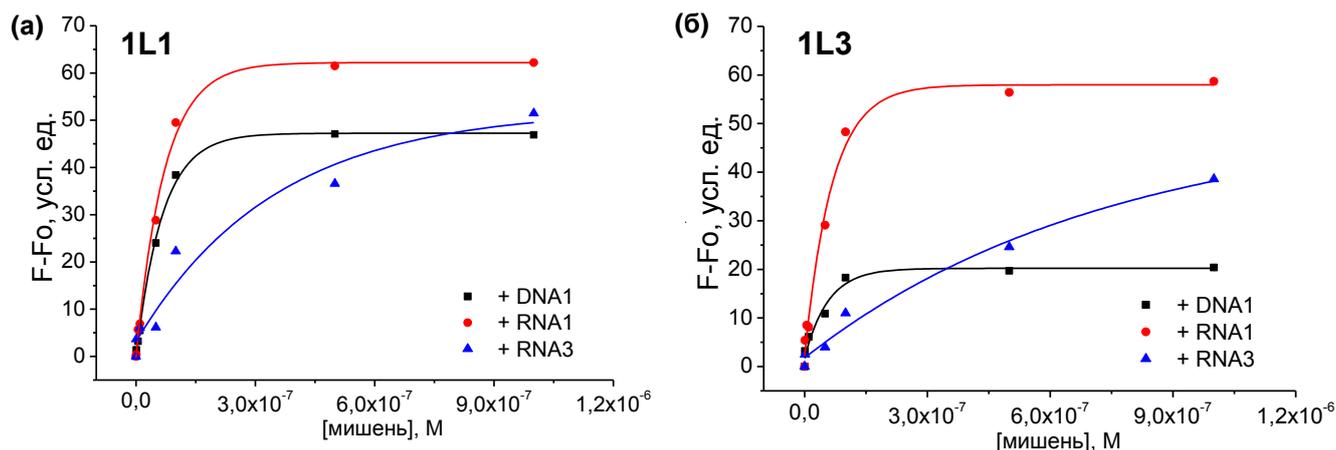


Рис. 2.16. Зависимость изменения эксимерной флуоресценции (480 нм) 2'-биспиренильных зондов *1L1* (а) и *1L3* (б) от концентрации НК-мишени. Последовательности НК-мишеней представлены на рисунке 2.12.

Из полученных результатов можно заключить, что минимальная концентрация короткой РНК-мишени, при которой ее можно достоверно определить созданными нами зондами, т.е. концентрация, при которой происходит увеличение интенсивности эксимерной флуоресценции зонда при гибридизации с мишенью более чем в три раза по сравнению со средним отклонением шумового сигнала [236], составила $5 \cdot 10^{-8}$ М для зондов *1L1*, *1L3*, *1L5*, *1L7*, *2L1* и *2L7*, и $1 \cdot 10^{-7}$ М для зондов *1L10* и *1L15*, при выбранных условиях гибридизации.

Таблица 2.8. Кажущиеся константы ассоциации (K_x) 2'-биспиренильных зондов с соответствующими НК-мишенями

#	K_x , л/моль		
	+ <i>DNA1</i>	+ <i>RNA1</i>	+ <i>RNA3</i>
<i>1L1</i>	$(7.1 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(3.2 \pm 0.2) \cdot 10^7$
<i>1L3</i>	$(1.2 \pm 0.04) \cdot 10^8$	$(4.5 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(7.4 \pm 0.1) \cdot 10^7$
<i>1L5</i>	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.2 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^7$
<i>1L7</i>	$(3.4 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(2.9 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(2.8 \pm 0.4) \cdot 10^7$
<i>1L10</i>	$(1.2 \pm 0.04) \cdot 10^8$	$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(8.8 \pm 0.4) \cdot 10^6$
<i>1L15</i>	$(1.7 \pm 0.03) \cdot 10^8$	$(1.2 \pm 0.04) \cdot 10^8$	$(4.2 \pm 0.6) \cdot 10^7$
	+ <i>DNA2</i>	+ <i>RNA2</i>	+ <i>RNA3</i>
<i>2L1</i>	$(2.2 \pm 0.04) \cdot 10^8$	$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(8.8 \pm 0.4) \cdot 10^6$
<i>2L7</i>	$(1.8 \pm 0.04) \cdot 10^8$	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^7$

Изменение интенсивности флуоресценции пиренильных зондов в зависимости от концентрации модельной НК в растворе позволяет также определить термодинамические параметры процесса комплексообразования. С использованием модифицированного уравнения Штерна-Фольмера [18] были рассчитаны эффективные константы ассоциации комплексов 2'-биспиренильных зондов с НК-мишенями (Кх, Табл. 2.8), как описано в разделах 3.3.23 и 3.3.24. Значения эффективных констант ассоциации 2'-биспиренильных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с соответствующими НК-мишенями были высокими (10^7 - 10^8 л/моль). Стоит отметить, что полученные нами значения этих констант при связывании 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с протяженной РНК-мишенью **RNA3** были до 75 раз выше по сравнению со значениями кажущихся констант ассоциации, опубликованными ранее для 5'-биспиренильных конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов с аналогичными участками **RNA3** [18].

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

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

Среди флуоресцентных зондов на основе пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов особый интерес представляют эксимер- и эксиплекс-формирующие тандемные зонды, которые обладают повышенной селективностью к НК-мишени [215], так как в этом случае специфический сигнал может возникнуть только вследствие строгого позиционирования молекул флуорофора с образованием эксимера или эксиплекса в результате связывания двух компонентов зонда с НК-мишенью.

2.2.1. Рациональный дизайн и химический синтез пирен-меченых тандемных зондов

При рациональном дизайне компонентов эксимер-образующих флуоресцентных тандемных зондов для детекции РНК мы сфокусировались на нескольких моментах. Во-первых, мы выбрали олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) в качестве основы для зондов так как они обладают высокой аффинностью к РНК, а также повышенной стабильностью к действию нуклеаз клетки и образуют дуплексы с РНК, структурно похожие на дуплексы РНК-РНК, что позволяет предсказывать их свойства. Кроме того, дуплексы олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с РНК не являются субстратами РНКазы H [237]. Во-вторых, ранее

было показано, что для эффективного образования эксимера при связывании tandemного зонда с РНК-мишенью необходимо близкое расположение и отсутствие нуклеотидов мишени в стыке между двумя остатками пирена компонентов зонда [70,129,158]. Также было показано, что наиболее эффективные кооперативные взаимодействия вследствие соосевого стэкинга пар оснований возникают в паре GC/G*рC, расположенной в стыке [238]. Принимая во внимание все описанные в литературе данные, мы предложили дизайн новых tandemных зондов, компоненты которых содержат остатки пирена, введенные в олигонуклеотидную цепь посредством линкеров различной длины и строения (Рис. 2.17).

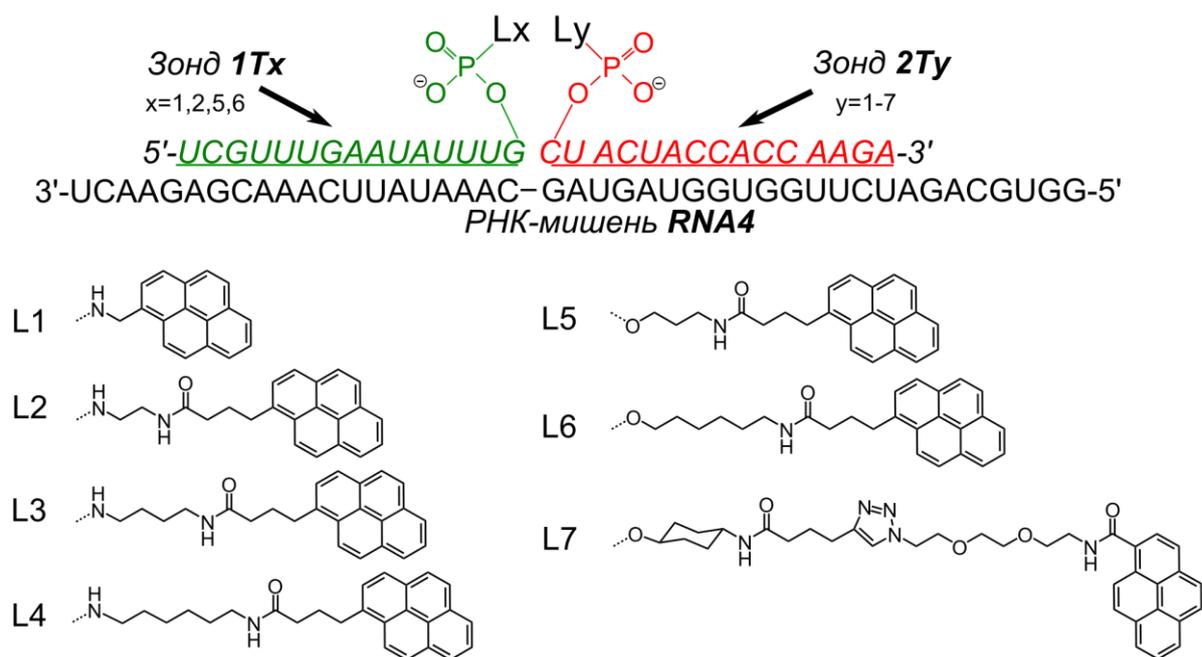


Рис. 2.17. Схематическое представление РНК-направленных эксимер-формирующих tandemных зондов, предложенных в данной работе. Зонды *1Tx* и *2Ty* – компоненты tandemных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидных) зондов, несущие 3'- или 5'-концевые пиренильные группы введенные посредством линкеров (*Lx* и *Ly*, соответственно) различного строения.

В качестве модельной РНК-мишени был выбран 43-звенный фрагмент 28S рибосомальной РНК человека (нуклеотиды 2319-2361) или мыши (нуклеотиды 2096-2138) [**RNA4**: 5'-r(GGUGCAGAUUCUUGGUGGUAGUAGCAAUAUUCAAACGAGAACU)] (фрагменты имеют одинаковую последовательность в человеческих и мышинных линиях клеток). Мы намеренно выбрали модельную короткую мишень таким образом, чтобы она соответствовала РНК-мишени, которая нарабатывается в клетках в большом количестве, и имела выраженную вторичную структуру. Различное количество пуриновых и пиримидиновых оснований в частях модельной РНК-мишени приводит к существенным отличиям в величинах температур плавления дуплексов компонентов tandemного зонда с РНК-мишенью, что

существенно облегчает интерпретацию результатов исследования термической стабильности этих дуплексов. Таким образом, мы выбрали подходящую РНК-мишень для демонстрации потенциала разработанных нами зондов эффективно связываться даже со структурированной РНК-мишенью и пригодности использования их в качестве зондов для визуализации внутриклеточной РНК-мишени.

К преимуществам синтеза олигонуклеотидов, содержащих концевые модификации, можно отнести большое разнообразие существующих методов и достаточно большой выбор различных линкеров, посредством которых возможно введение необходимых функциональных групп.

Для получения 5'- и 3'-монопиренильных производных олигонуклеотидов необходимо было предварительно синтезировать модифицированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды)-предшественники (**1Tp**, **2Tp**, **1T5a**, **1T6a**, **2T5a**, **2T6a** и **2T7a**), содержащие реакционноспособные группы (фосфат, аминоклинкеры различной длины, алкиновую группу) в терминальных положениях (см. Табл. 2.9). Синтез модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) был выполнен с использованием твердофазного автоматического фосфитамидного метода.

Синтез 3'-фосфорилированного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (**1Tp**) и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**1T5a**, **1T6a**), содержащих аминопропильный или аминогексильный линкер на 3'-конце, осуществляли автоматическим фосфитамидным твердофазным методом с использованием полимерных носителей 2-[2-(4,4'-диметоксиэтилокси)этилсульфонил]этил-2-сукционил)-Icaa-CPG (**2.6**), *N*-(3-(*O*-диметокситритил)-пропил)-(2-карбоксамид)-фталимидил-Icaa-CPG (**2.7**) и *N*-(3-(*O*-диметокситритил)-гексил)-(2-карбоксамид)-фталимидил-Icaa-CPG (**2.8**), соответственно (Рис. 2.18).

Для получения 5'-фосфорилированного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (**2Tp**) предварительно синтезировали немодифицированный олигонуклеотид с использованием нуклеозидсодержащего полимерного носителя 5'-*O*-диметокситритил-*N*6-бензоил-2'-*O*-метиладенозин-3'-сукцинил-Icaa-CPG. 5'-Деблокированный и защищенный по межнуклеозидным фосфатам и гетероциклическим основаниям олигонуклеотид, присоединенный к полимерному носителю, фосфорилировали на финальной стадии фосфитамидного синтеза с использованием раствора 2[2-(4,4'-диметокситритилокси)-этилсульфонил]-этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (**2.12**) (химический фосфорилирующий реагент) (Рис. 2.18) в абс. ацетонитриле в присутствии 5-этилтио-1*H*-тетразола в качестве конденсирующего агента (время конденсации – 10 мин). После проведения конденсации удаляли защитную диметокситритильную группу и окисляли межнуклеозидную фосфитную группу до фосфатной. После окончания синтеза проводили финальное

деблокирование защитных групп и отделение полученного олигонуклеотида от полимерного носителя в стандартных условиях обработкой 40%-ным водным метиламином.

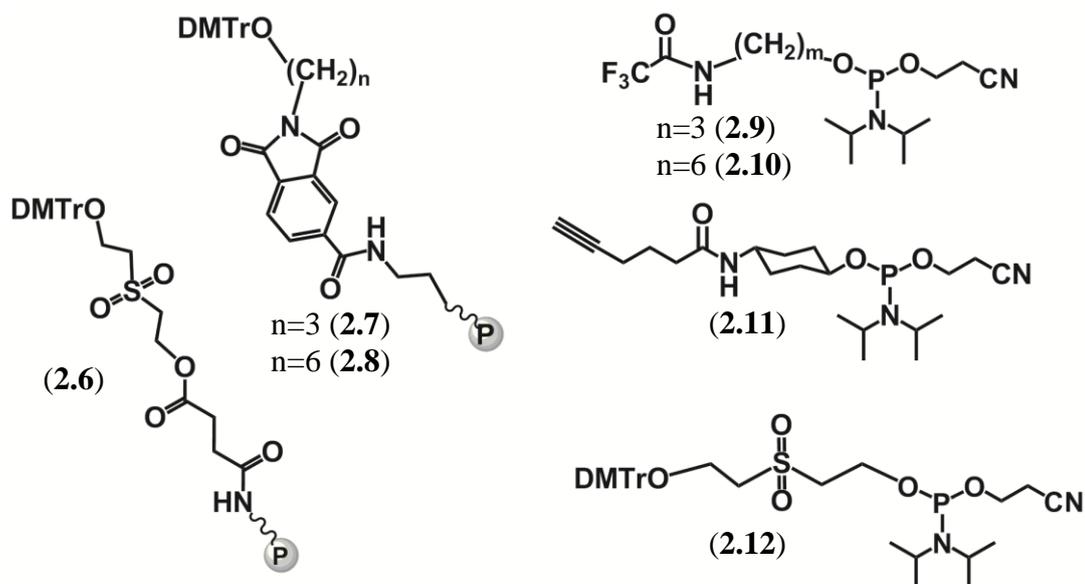


Рис. 2.18. Структуры реагентов, использованных для синтеза 5'- и 3'-модифицированных производных олигонуклеотидов (*1Tp*, *2Tp*, *1T5a*, *1T6a*, *2T5a*, *2T6a* и *2T7a*).

Синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*2T5a*, *2T6a*), содержащих аминопропильный или аминогексильный линкер на 5'-конце, и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (*2T7a*), содержащего 5'-концевую алкиновую группу, осуществляли аналогично синтезу (*2Tp*), но модификацию на финальной стадии фосфитамидного синтеза осуществляли с использованием раствора 3-(трифторацетиламино)-пропил-(2-цианоэтил)-(*N,N*-диизопропил)-фосфитамида (**2.9**), 6-(трифторацетиламино)-гексил-(2-цианоэтил)-(*N,N*-диизопропил)-фосфитамида (**2.10**) или (1*R*,4*R*)-4-гекс-5-иламиноциклогексил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (**2.11**) в присутствии 5-этилтио-1*H*-тетразола в качестве конденсирующего агента (Рис. 2.18). Последовательности модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) представлены в таблице 2.9.

Таблица 2.9. Свойства синтезированных 3'- и 5'-модифицированных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов)

№	Модифицированный олиго(2'- <i>O</i> -метилрибонуклеотид), 5'-3'	Выход, ¹ %	Время удерживания, ² мин
1Tр	5'-m(CUACUACCACCAAGA)-3'-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-	13.8	8.3
1T2a	5'-m(CUACUACCACCAAGA)-3'-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -NH-CH ₂ -NH ₂	14.4	8.3
1T5a	5'-m(CUACUACCACCAAGA)-3'-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	15.3	8.3
1T6a	5'-m(CUACUACCACCAAGA)-3'-O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	15.9	8.5
2Tр	⁻ O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG)	11.4	8.6
2T2a	H ₂ N-CH ₂ -NH-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG)	14.4	8.4
2T3a	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -NH-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG)	16.8	8.6
2T4a	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG)	12.3	8.7
2T5a	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG)	10.2	8.4
2T6a	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG)	11.1	8.4
2T7a	HC≡C-CH ₂ -CH ₂ -NH-C(=O)-N(CH ₂) ₂ -O-P(=O)(O ⁻) ₂ -O-5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG)	24.6	9.0

¹ Выход после выделения препаративным гель-электрофорезом в расчете на первое нуклеозидное звено,

² Времена удерживания производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (условия офВЭЖХ см. Методики эксперимента).

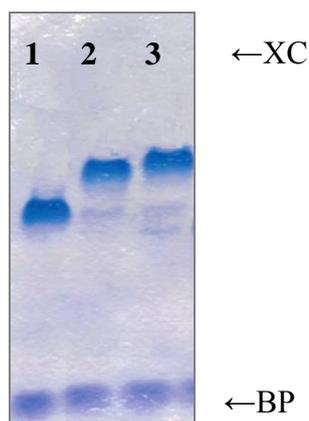


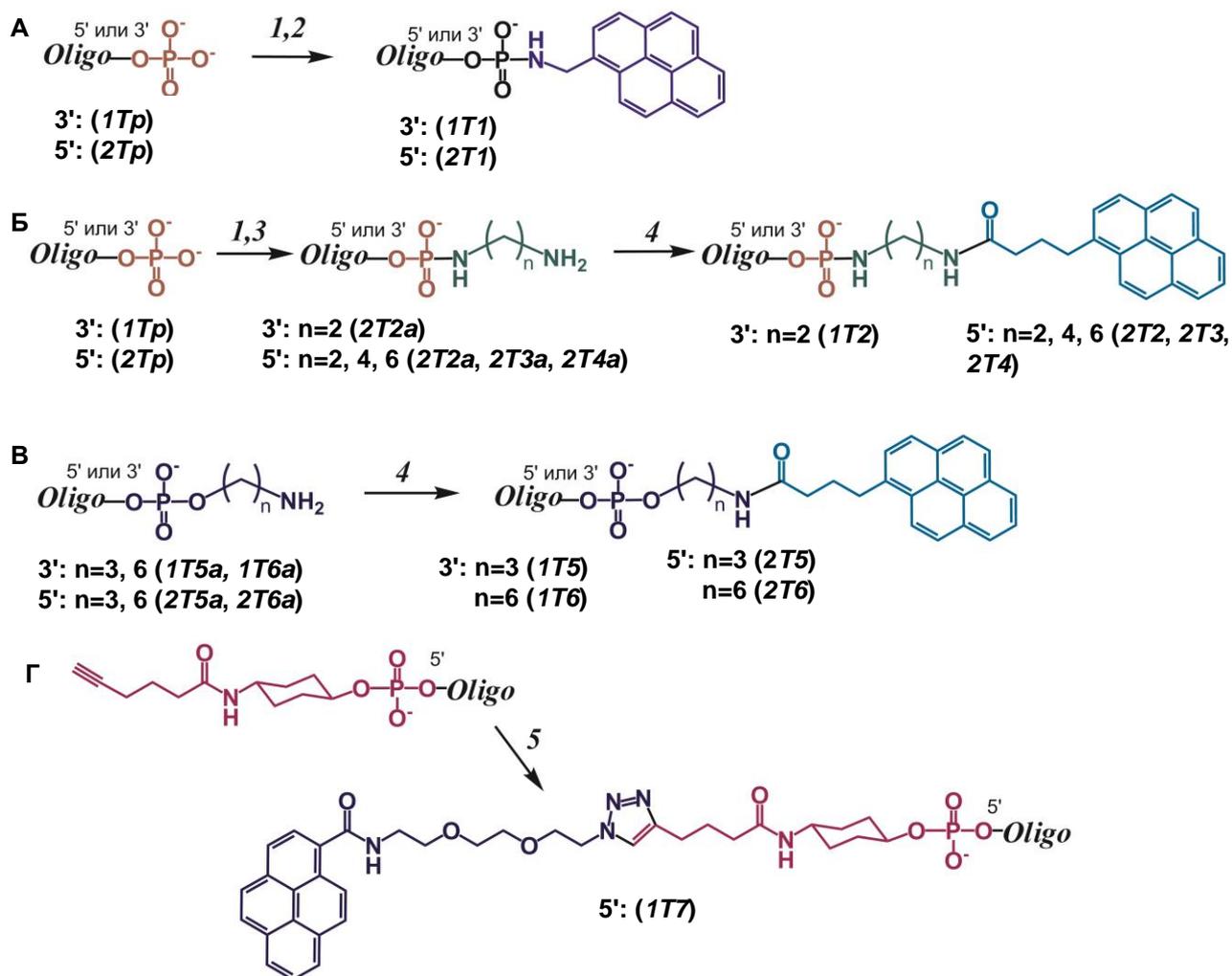
Рис. 2.19. Электрофоретический анализ реакционных смесей производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**1Тр**), (**1Т5а**), (**1Т6а**) (дорожки 1-3, соотв.). Последовательность олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и структуры линкеров представлены в таблице 2.9.

Полученные реакционные смеси анализировали в 15%-ном ПААГ (см., например, Рис. 2.19). Выделение олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) из реакционных смесей проводили методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующим обессоливанием и осаждением в виде натриевых солей.

Следующим этапом работы было введение остатков пирена в синтезированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды). Введение остатка пирена на 3'- или 5'-конец олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**1Т1**, **1Т2**, **2Т1**, **2Т2**, **2Т3** и **2Т4**) осуществляли через активацию конечного фосфата олигонуклеотида окислительно-восстановительной парой реагентов трифенилфосфин-дипиридилдисульфид в присутствии 4-*N,N'*-диметиламинопиридина в качестве нуклеофильного катализатора с последующим взаимодействием активированного фосфата с лигандом, несущим нуклеофильную аминогруппу.

Для получения производных (**1Т1**, **2Т1**) после активации конечного фосфата олигонуклеотидов (**1Тр**, **2Тр**) избыток активирующих реагентов и нуклеофильного катализатора удаляли путем осаждения олигонуклеотида 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне. Это позволяло избежать повторной активации конечного фосфата и последующего присоединения второго остатка пирена. Олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) с активированным конечным фосфатом растворяли в воде и вводили в реакцию с 1-пиренилметиламином в смеси DMSO и триэтиламина при комнатной температуре (Схема 2.6А). Присутствие триэтиламина было необходимо для поддержания аминогруппы 1-пиренилметиламина в депротонированном состоянии.

Схема 2.6



Синтез монопиренильных производных олиго(2'-*O*-рибонуклеотидов): 1) трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид, 4-диметиламинопиридин, DMSO, 56 °С, 15 мин; 2) гидрохлорид пиренилметиламина, Et₃N, DMSO, 56 °С, 2 ч; 3) диамин (этилендиамин, n=2; 1,4-диаминобутан, n=4; 1,6-диаминогексан, n=6), 37 °С, 1 ч; 4) *N*-оксисукцинимид 1-пиренбутановой кислоты, DMFA, 0.1 М NaHCO₃, pH 8.3, 37 °С, 2 ч; 5) *N*-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)пирен-1-карбоксамид, Cu(II)/TBTA, 0.5 мМ аскорбиновая кислота, 0.2 М триэтиламмоний ацетат, pH 7.0, DMSO. Последовательности **1Т**: 5'-m(CUACUACCACCAAGA) и **2Т**: 5'-m(UCGUUUGAAUAAUUUG). Oligo – деблокированный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид).

Для получения монопиренильных производных (**1Т2**, **2Т2**, **2Т3** и **2Т4**) сразу после активации конечного фосфата олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид) (**1Тр** или **2Тр**) вводили в реакцию с диамином (этилендиамином, 1,4-диаминобутаном или 1,6-диаминогексаном). Монопиренильные конъюгаты получали взаимодействием полученных аминопроизводных олигонуклеотидов (**1Т2а**, **2Т2а**, **2Т3а** и **2Т4а**, см. Табл. 2.9) с *N*-оксисукцинимидным эфиром пиренбутановой кислоты в смеси DMFA с водой при pH 8.3-8.5 (Схема 2.6Б). Данный диапазон значений pH позволяет сохранить конечные аминогруппы в депротонированном состоянии и одновременно избежать щелочного гидролиза *N*-оксисукцинимидного эфира.

Для получения пиренильных производных (**1Т5**, **1Т6**, **2Т5** и **2Т6**) исходили из 5'- или 3'-

аминомодифицированных олигонуклеотидов (*1T5a*, *1T6a*, *2T5a* и *2T6a*, соответственно), которые вводили в реакцию с *N*-оксисукцинимидным эфиром пиренбутановой кислоты в смеси DMFA с водой при pH 8.3-8.5 (Схема 2.6В).

Другим удобным способом введения одного остатка пирена в терминальное положение олигонуклеотида является такой современный синтетический подход к конъюгированию сложных органических молекул как "клик"-химия. Для получения монопиренильного производного (*1T7*) после синтеза олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (*1T7a*) с 5'-концевой тройной связью его растворяли в pH-нейтральной смеси воды и DMSO, содержащей комплекс *Cu(II)*-ТВТА, и последовательно прибавляли раствор *N*-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)пирен-1-карбоксамид в DMSO и раствор аскорбиновой кислоты (Схема 2.6Г). Присутствие аскорбиновой кислоты было необходимо для постоянного поддержания достаточной концентрации одновалентной меди, которая катализирует процесс.

По окончании реакций олигонуклеотидный материал осаждали 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне.

Полученные реакционные смеси производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) анализировали методом аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Следует отметить, что во всех случаях степень превращения исходных олигонуклеотидов в пиренильные конъюгаты была не менее 85%. Выделение всех синтезированных монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) из реакционных смесей проводили методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующим обессоливанием и осаждением в виде литиевых солей. Выходы синтезированных монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) составили 21.4-68.0 % (Табл.2.10). Пиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) во всех случаях обладали заметно меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с исходными модифицированными олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидами)-предшественниками (Рис. 2.20).

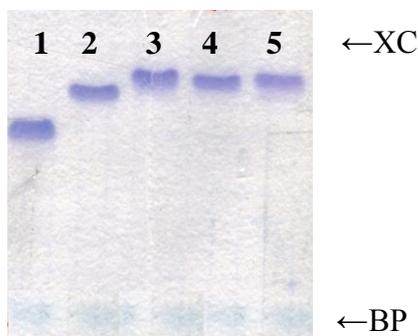


Рис. 2.20. Типичная электрофореграмма выделенных 5'-пирен-модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*2T1*), (*2T6*), (*2T3*) и (*2T4*) (дорожки 2-5, соотв.). В качестве контроля использовали 5'-фосфорилированный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид) (*2L*) (дорожка 1).

В качестве дополнительного метода анализа реакционных смесей синтезированных монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) использовали аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ (офВЭЖХ). Исходные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (*1T* и *2T*) имели одинаковую длину и близкий нуклеотидный состав. Времена их удерживания на офВЭЖХ были близкими и практически не зависели от того, какая функциональная группировка была введена по концу. Времена удерживания пиренильных конъюгатов на офВЭЖХ были выше по сравнению с исходными олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидами), что объясняется введением в их состав гидрофобного остатка пирена (Рис.2.21). Была выявлена зависимость времени удерживания пиренильных конъюгатов от длины линкера.

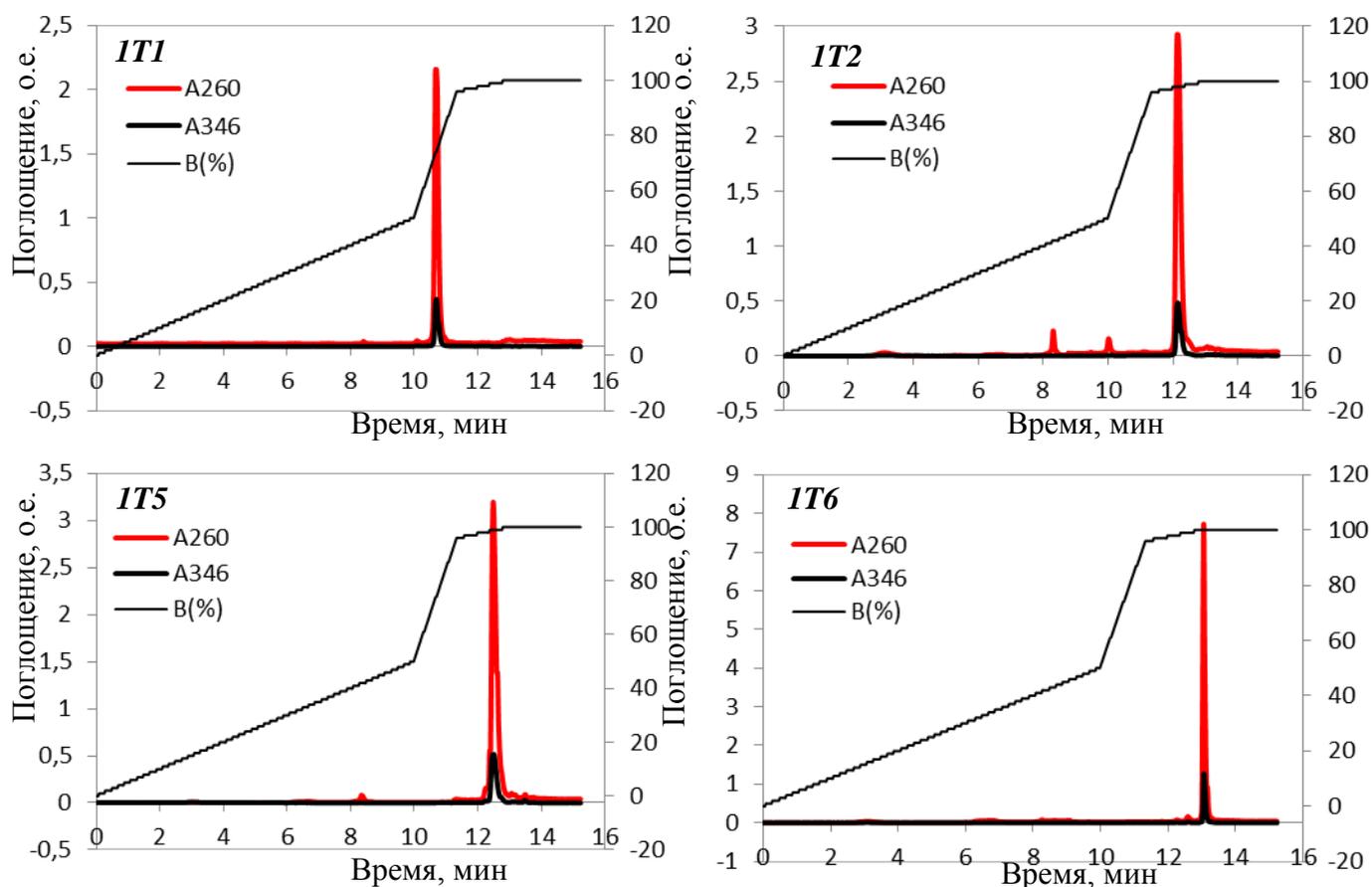


Рис. 2.21. Хроматограммы 3'-монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *IT1*, *IT2*, *IT5* и *IT6*, соответственно, после выделения гель-электрофорезом в денатурирующих условиях.

Строение полученных модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) подтверждали методом MALDI TOF-масс-спектрометрии (Табл. 2.10).

Таблица 2.10. Характеристики синтезированных 5'- и 3'-монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов)

№	Выход, ¹ %	Время удерживания, ² мин	Молекулярная масса	
			Рассчитано, m/z	Найдено, ³ m/z [M-H] ⁺
<i>1T1</i>	27.7	10.7	5220.4	5221.1
<i>1T2</i>	31.4	12.1	5319.6	5321.0
<i>1T5</i>	28.9	12.5	5334.6	5333.8
<i>1T6</i>	30.2	12.9	5322.7	5324.0
<i>2T1</i>	24.6	10.6	5206.6	5207.2
<i>2T2</i>	27.4	12.8	5305.7	5306.9
<i>2T3</i>	25.3	12.5	5334.0	5335.6
<i>2T4</i>	21.4	12.9	5361.5	5362.5
<i>2T5</i>	35.6	12.6	5376.6	5378.2
<i>2T6</i>	38.2	13.0	5364.8	5365.7
<i>2T7</i>	68.0	13.4	5628.4	5633.9

¹Выходы 3'- и 5'-монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) на стадию модификации соответствующим пиренильным производным и после выделения препаративным гель-электрофорезом. ²Времена удерживания производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (условия офВЭЖХ см. 3.2.5). ³ По данным MALDI-TOF масс-спектрометрии. Последовательность олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и структуры линкеров представлены на рисунке 2.17.

Строение полученных монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) также подтверждали спектрофотометрическими методами. В электронных спектрах поглощения конъюгатов наблюдали пики при 260 нм, соответствующие поглощению олигонуклеотидной части, и два характерных пика при 330 и 345 нм, соответствующие поглощению пирена. На рисунке 2.22 для примера приведен типичный спектр поглощения монопиренильного конъюгата (*2T1*).

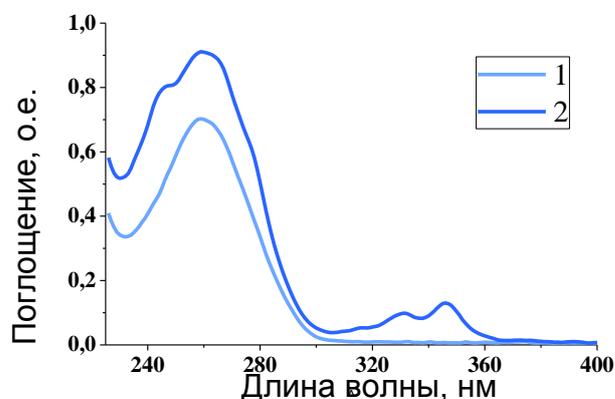


Рис. 2.22. Типичные УФ-видимые спектры поглощения растворов немодифицированного и 5'-монопиренильного производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (*2T1*) (спектры 1 и 2, соотв.). Концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.

Соотношение поглощения на длинах волн 260 и 345 нм, полученное из эксперимента, соответствовало теоретическому соотношению коэффициентов молярного поглощения, рассчитанному для монопиренмодифицированных олигонуклеотидов, что подтверждало наличие одного пиренильного остатка в составе всех синтезированных пиренильных конъюгатов.

Изучению свойств созданных tandemных зондов посвящены следующие разделы работы.

2.2.2. Термическая стабильность дуплексов tandemных зондов

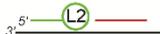
Как правило, вследствие гидрофобности и ароматического характера пирена, введение его на 5'- или 3'-конец олигонуклеотида может привести к π - π взаимодействию (т.е. π -стэкингу) пирена с азотистыми основаниями или интеркаляции пирена в НК-дуплекс, и, как следствие, к дополнительной стабилизации дуплекса [8]. В то же время, кооперативные взаимодействия между компонентами tandemного зонда способствуют образованию более стабильных дуплексов с НК-мишенью в трехкомпонентном комплексе по сравнению с соответствующими НК-дуплексами индивидуальных зондов. Для того чтобы исследовать влияние пирена и кооперативных взаимодействий на термическую стабильность дуплексов tandemных зондов с РНК-мишенями, мы провели подробное исследование термической стабильности дуплексов tandemных зондов и их компонентов с модельной 43-звенной РНК-мишенью (совместно с к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым, ЛБМХ ИХБФМ СО РАН).

В кривых плавления дуплексов как не модифицированных, так и пирен-модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с комплементарной РНК-мишенью наблюдали типичные сигмоидальные моно- и бифазные переходы (см., например, Рис. 2.21). Температуры плавления НК-комплексов (T_{\max}), полученные в данном эксперименте, приведены в таблицах 2.11-2.13.

Вклад терминальных модификаций Lx и Ly в термическую стабильность дуплексов $1Tx \cdot RNA$ и $2Ty \cdot RNA4$, соответственно, оценивали, сравнивая значения их T_{\max} и значения T_{\max} для дуплексов немодифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) $1T$ и $2T$ с модельной РНК-мишенью (дуплексы $1T \cdot RNA4$ и $2T \cdot RNA4$, соответственно). Различное количество тугоплавких GC-пар в дуплексах $1T \cdot RNA4$ и $2T \cdot RNA4$ (4 и 7, соответственно) приводит к существенной разнице в термической стабильности этих дуплексов (53.4 °C для $1T \cdot RNA4$ и 67.0 °C для $2T \cdot RNA4$). Из полученных данных следует, что введение пиренильных остатков на 3'-конец олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) $1T$ приводит к значительному увеличению

термической стабильности дуплексов *ITx·RNA4* ($\Delta T_{\max} = +3.7-4.3$ °C), что говорит о наличии дополнительных стабилизирующих взаимодействий (Табл. 2.11).

Таблица 2.11. Термическая стабильность дуплексов 5'-монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **1T1**, **1T2**, **1T5** и **1T6** с модельной РНК-мишенью

Зонд ^а	Иллюстрация ^б	T_{\max} , °C ^в	Зонд ^а	Иллюстрация ^б	T_{\max} , °C ^в
1T1+2T		62.3	1T1		57.5
1T2+2T		62.2	1T2		57.7
1T5+2T		62.5	1T5		57.7
1T6+2T		62.6	1T6		57.1

^а Последовательности зондов и структуры всех пиренильных линкеров приведены на рисунке 2.17.

^б Зелеными, красными и черными линиями обозначены немодифицированный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид) **2T**, зонды **ITx** и РНК-мишень **RNA4**, соотв. ^в T_{\max} – температура, соответствующая максимуму первой производной кривой термической денатурации (поглощение при 260 нм от температуры). Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.

2T: 5'-m(UCGUUUGAAUAUUUG),

RNA4: 5'-r(GGUGCAGAUCUUGGUGGUAGUAGCAAUAUUCAAACGAGAACU).

Таблица 2.12. Термическая стабильность дуплексов 5'-монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **2T1-2T7** с модельной РНК-мишенью

Зонд ^а	Иллюстрация ^б	T_{\max} , °C ^в ($T_{\max 1}/T_{\max 2}$, °C)	Зонд ^а	Иллюстрация ^б	T_{\max} , °C ^в
1T+2T1		56.0/66.4	2T1		70.2
1T+2T2		57.2/68.4	2T2		69.7
1T+2T3		57.4/67.0	2T3		69.9
1T+2T4		57.0/67.3	2T4		68.0
1T+2T5		57.1/66.7	2T5		69.0
1T+2T6		58.5/66.2	2T6		68.4
1T+2T7		55.9/65.6	2T7		66.4

^а Последовательности зондов и структуры всех пиренильных линкеров приведены на рисунке 2.17.

^б Зелеными, красными и черными линиями обозначены немодифицированный олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид) **1T**, зонды **2Ty** и РНК-мишень **RNA4**, соотв. ^в T_{\max} – температура, соответствующая максимумам первой производной кривой термической денатурации (поглощение при 260 нм от температуры). $T_{\max 1}$ и $T_{\max 2}$ соответствуют плавлению 1) (**1T+2Ty**)·**RNA** на **1T** и **2Ty**·**RNA4**, и 2) **2Ty**·**RNA4** на **2Ty** и **RNA4**, соотв. Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ. **1T**: 5'-m(CUACUACCACCAAGA).

Ранее авторами работы [155] было продемонстрировано, что введение одного остатка пирена в 5'-положение приводит к незначительному повышению стабильности дуплексов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с РНК. Мы показали, что в случае дуплексов 5'-пирен-меченных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **2Ty** с РНК-мишенью, значения T_m возрастают

для зондов с гибкими линкерами **L1-L6** ($\Delta T_{\max} = +1.4-3.2$ °C), и уменьшаются для зонда с длинным жестким линкером **L7** ($\Delta T_{\max} = -0.6$ °C). Вероятно, пиренильный остаток, введенный посредством гибких линкеров, может интеркалировать внутрь дуплекса; в случае же линкера **L7** пиренильный остаток оказывается вытесненным из дуплекса (Табл. 2.12). Данное предположение также подтверждают результаты, полученные при исследовании изменения спектров поглощения НК-дуплексов *ITx·RNA4* и *2Ty·RNA4*, *(ITx+2T)·RNA4* и *(IT+2Ty)·RNA4* в диапазоне длин волн 220-400 нм при изменении температуры от 5 до 90 °C (Рис.2.23, 2.24). В случае дуплексов *ITx·RNA4*, *2Ty·RNA4* и *(ITx+2T)·RNA4* кривые плавления при 260 нм совпадали с кривыми, полученными при 340 нм (монофазный переход).

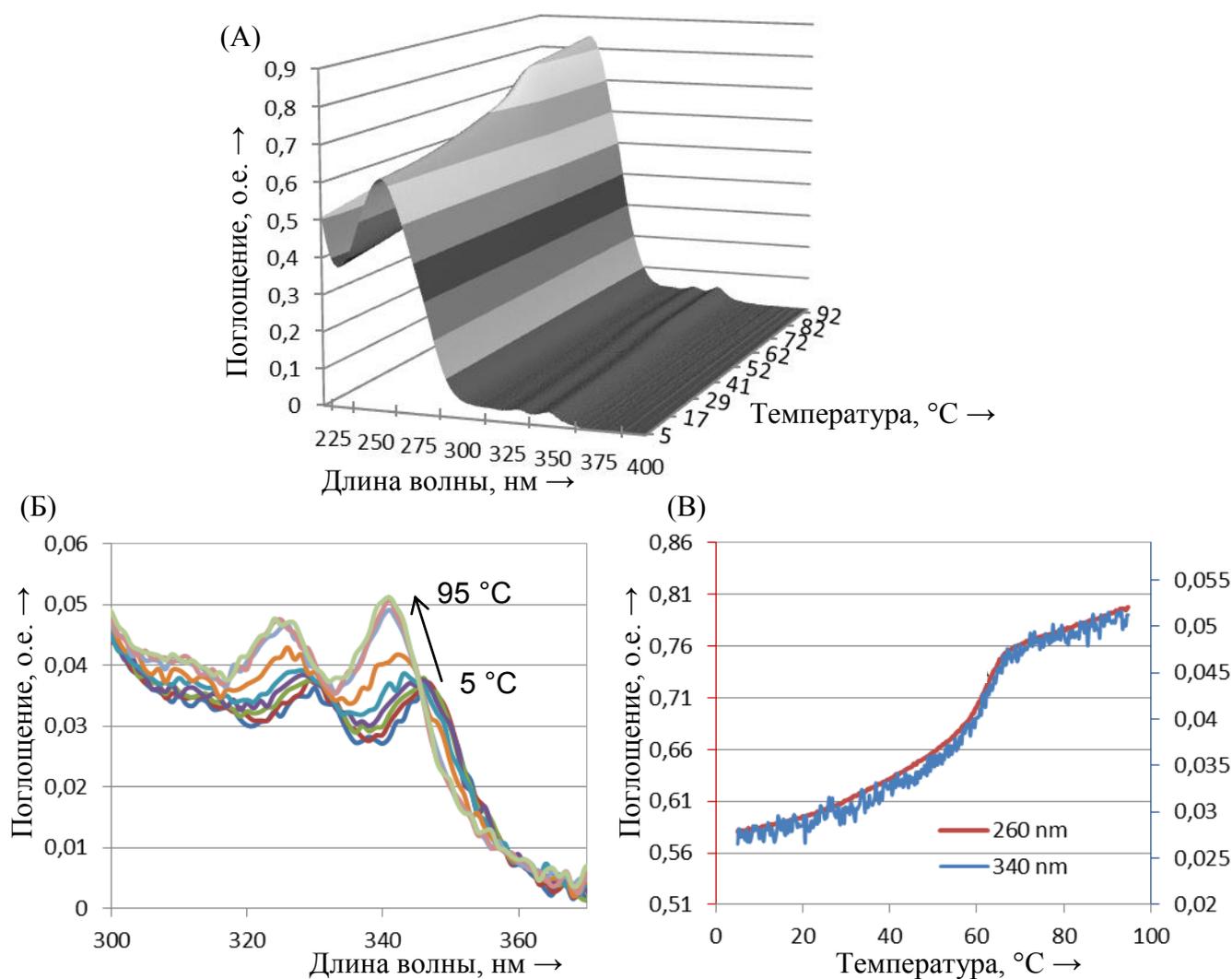


Рис. 2.23. Изменения спектров поглощения дуплекса *ITI·RNA4* (A) в зависимости от температуры в диапазоне длин волн 220-400 нм, (B) в диапазоне длин волн 310-370 нм (поглощение пиренильного остатка), (B) кривые поглощения дуплекса *ITI·RNA4* при нагревании от 5 до 90 °C. Концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.

Для того, чтобы оценить вклад кооперативных взаимодействий в термическую стабильность дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью, мы сравнили температуры плавления комплексов $1T \cdot RNA4$, $2T \cdot RNA4$, $1Tx \cdot RNA4$ и $2Ty \cdot RNA4$ со значениями T_m для $(1T+2T) \cdot RNA4$, $(1Tx+2T) \cdot RNA4$, $(1T+2Ty) \cdot RNA4$, соответственно. Для дуплекса $(1T+2T) \cdot RNA4$ в кривых плавления наблюдали двойной переход с $T_{max1} = 58.5^\circ\text{C}$, и $T_{max2} = 65.4^\circ\text{C}$. Можно заключить, что в данном дуплексе кооперативные взаимодействия дополнительно стабилизируют $1T \cdot RNA4$ часть дуплекса ($\Delta T_{max} = +5.1^\circ\text{C}$) и дестабилизируют $2T \cdot RNA4$ часть ($\Delta T_{max} = -1.6^\circ\text{C}$).

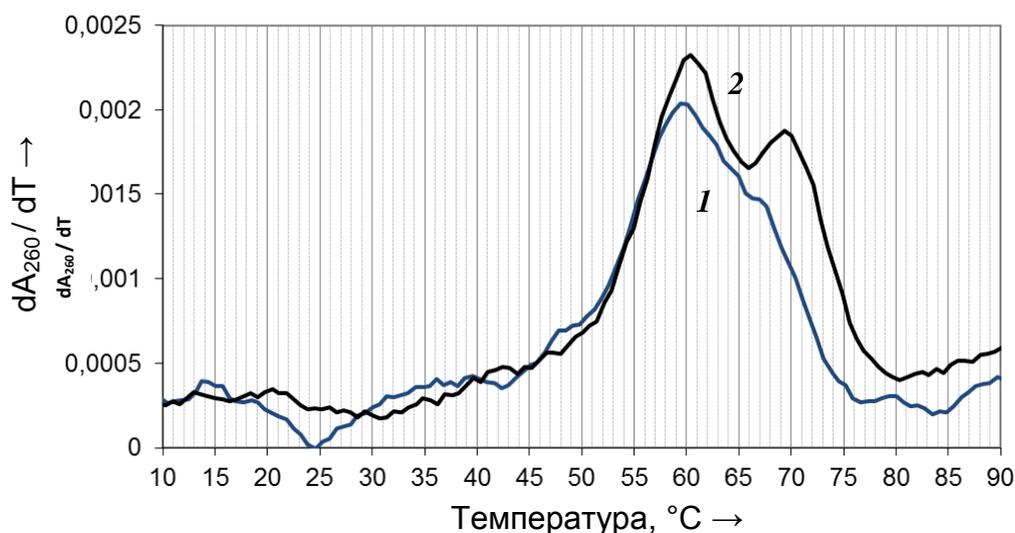


Рис. 2.24. Дифференциальные кривые плавления дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью (1) $(1T6+2T5) \cdot RNA4$ и (2) $(1T6+2T2) \cdot RNA4$. Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na_2 ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.

Введение остатка пирена на 3'-конец олиго(2'-O-метилрибонуклеотида) $1T$ существенно стабилизирует $1T \cdot RNA4$ часть дуплекса ($\Delta T_{max} = \sim +5^\circ\text{C}$), приводит к появлению широкого монофазного перехода, то есть к практически одновременной диссоциации компонентов тандемного зонда $(1Tx+2T) \cdot RNA4$ ($T_{max} = 62.2-62.6^\circ\text{C}$). Введение остатка пирена в 5'-модифицированный компонент тандемного зонда стабилизирует часть $2T \cdot RNA4$ дуплекса $(1T+2Ty) \cdot RNA4$, в результате чего происходит двухстадийное плавление дуплекса (бифазный переход с $T_{max1} = 55.9-58.5^\circ\text{C}$ и $T_{max2} = 65.6-68.4^\circ\text{C}$).

В таблице 2.13 представлены температуры плавления (T_{max}) для дуплексов тандемных пирен-меченых зондов с модельной РНК-мишенью $(1Tx+2Ty) \cdot RNA4$. В случае дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью $(1Tx+2Ty) \cdot RNA4$ повышенная термическая стабильность этих дуплексов, вероятно, является следствием суперпозиции кооперативных взаимодействий в результате соосевого стэкинга оснований в стыке, а также взаимодействия остатков пирена с НК-дуплексом. Вдобавок, из полученных

данных можно сделать вывод о том, что термическая стабильность этих дуплексов не зависит от структуры и длины линкеров между остатком пирена и олигонуклеотидом.

Таблица 2.13. Термическая стабильность дуплексов монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *1T1*, *1T2*, *1T5* и *1T6*, *2T1-2T7* с модельной РНК-мишенью

Зонд ^а	Иллюстрация ^б	T _{max} , °C ^в (T _{max1} /T _{max2} , °C)	Зонд ^а	Иллюстрация ^б	T _{max} , °C ^в (T _{max1} /T _{max2} , °C)
<i>1T1+2T1</i>		57.3/67.6	<i>1T5+2T1</i>		59.7
<i>1T1+2T2</i>		60.4/69.4	<i>1T5+2T2</i>		60.6/69.6
<i>1T1+2T3</i>		59.5/67.2	<i>1T5+2T3</i>		62.1/69.0
<i>1T1+2T4</i>		61.9	<i>1T5+2T4</i>		61.3/66.9
<i>1T1+2T5</i>		60.6/68.4	<i>1T5+2T5</i>		59.9
<i>1T1+2T6</i>		61.9/69.0	<i>1T5+2T6</i>		60.1/67.6
<i>1T1+2T7</i>		59.4/66.3	<i>1T5+2T7</i>		61.7/67.1
<i>1T2+2T1</i>		58.7/66.4	<i>1T6+2T1</i>		59.5/67.9
<i>1T2+2T2</i>		59.2/70.8	<i>1T6+2T2</i>		61.0/70.1
<i>1T2+2T3</i>		59.0/67.1	<i>1T6+2T3</i>		61.1/68.1
<i>1T2+2T4</i>		59.7/68.3	<i>1T6+2T4</i>		61.5
<i>1T2+2T5</i>		58.9/69.3	<i>1T6+2T5</i>		60.3
<i>1T2+2T6</i>		61.7	<i>1T6+2T6</i>		61.8/67.7
<i>1T2+2T7</i>		60.9/67.3	<i>1T6+2T7</i>		61.2/67.4

^а Последовательности зондов и структуры всех пиренильных линкеров приведены на рисунке 2.17. ^б Зелеными, красными и черными линиями обозначены зонды *1Tx*, зонды *2Ty* и РНК-мишень, соотв. ^в T_{max} – температура, соответствующая максимумам первой производной кривой термической денатурации (поглощение при 260 нм от температуры). T_{max1} и T_{max2} соответствуют плавлению 1) (*1Tx+2Ty*)-*RNA4* на *1Tx* и *2Ty-RNA4*, и 2) *2Ty-RNA4* на *2Ty* и *RNA4*, соотв. Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.

Стоит отметить, что данные результаты полностью согласуются с работой, выполненной в лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН [131], в которой описан аналогичный вклад пиренильных остатков, введенных через 3'- и 5'-концевой фосфат на термическую стабильность тандемных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции мисматчей в ДНК-мишенях.

Таким образом, было показано, что тандемные зонды на основе монопиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) образуют стабильные комплексы с РНК, при этом термическая устойчивость их зависит от типа дуплекса и ближайшего окружения пирена.

2.2.3. Сравнительное исследование чувствительности флуоресценции пиренильных тандемных зондов к образованию дуплексов с РНК

Были получены спектры флуоресценции тандемных зондов, основанных на полученных монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), а также их дуплексов с комплементарной РНК-мишенью. В спектрах испускания флуоресценции 3'- и 5'-монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) наблюдали два пика с максимумами при 378 и 391 нм (колебательные полосы I и III мономера пирена [16]) с низкими интенсивностями и высоким соотношением интенсивностей полос III/I, что свидетельствует о локальном гидрофобном окружении остатков пирена (Рис.2.25). При гибридизации компонентов тандемных зондов с модельной комплементарной РНК-мишенью наблюдали уменьшение интенсивности флуоресценции пирена и увеличение соотношения интенсивностей полос III/I; при этом для 5'-модифицированных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) этот эффект был наиболее выраженным.

Полученные данные согласуются с ранее опубликованными данными о тушении мономерной флуоресценции пирена посредством переноса электронов от/к соседним азотистым основаниям [22].

Для эффективного образования эксимера, молекулы пирена должны быть ориентированы параллельно и межпланарное расстояние должно быть 3-4 Å. Таким образом, относительное расположение остатков пирена сильно влияет на их способность образовывать эксимер [15,19]. Marti и соавторы ранее предложили тандемные зонды, основанные на пирен-меченных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидах) для детекции внутриклеточной мРНК сенсорина с использованием флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением [132]. Они исследовали зависимость интенсивности эксимерной флуоресценции пирена от количества азотистых оснований мишени между двумя остатками пирена в дуплексе зондов с РНК, а также длины линкеров между пиреном и олигонуклеотидом. Они обнаружили, что наибольшая интенсивность эксимерной флуоресценции пирена соответствует случаю с наименьшим расстоянием (т.е. при отсутствии дополнительных нуклеотидов мишени) между компонентами зонда и при использовании зондов с относительно короткими линкерами.

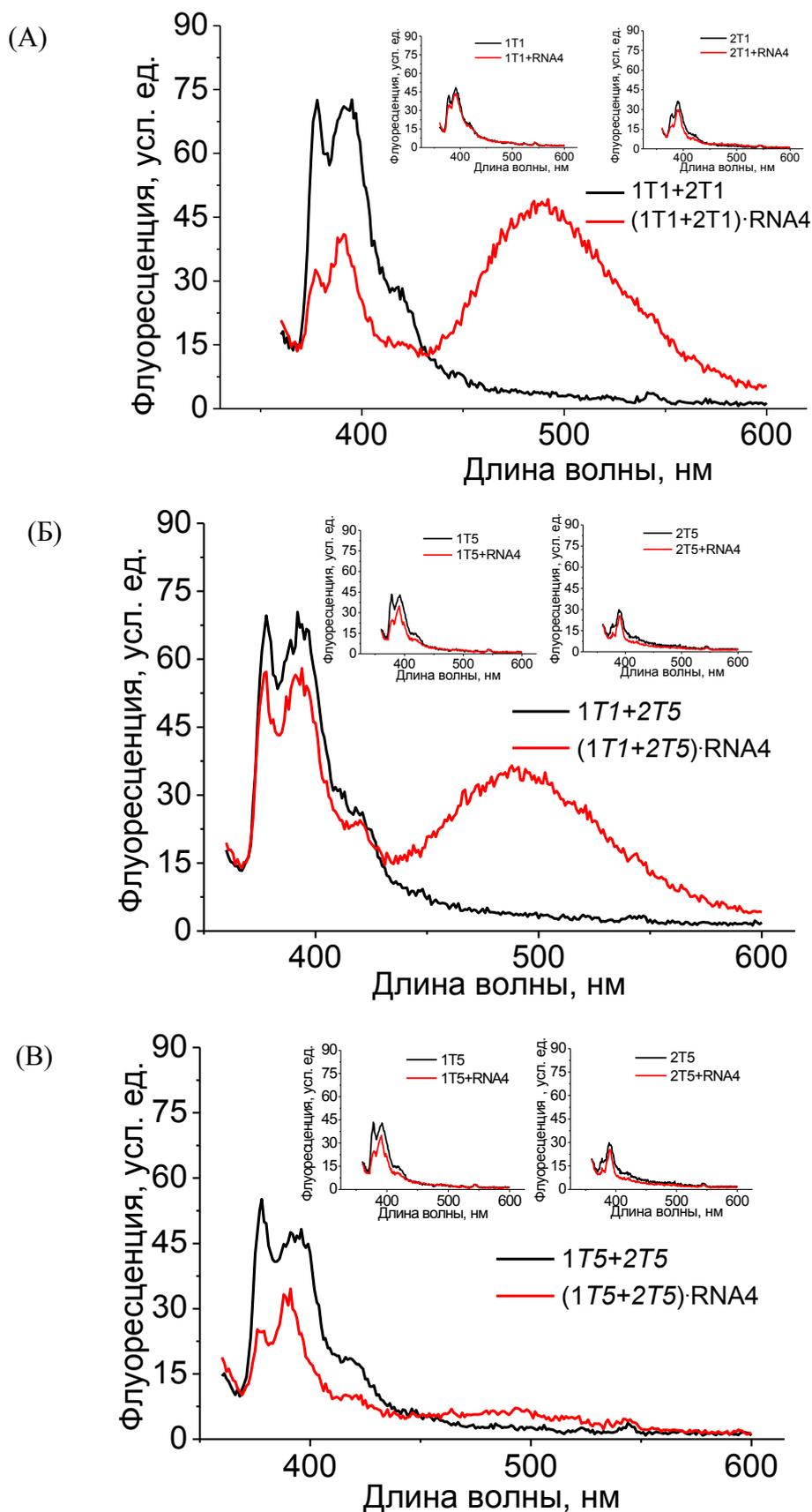


Рис. 2.25. Спектры флуоресценции тандемных зондов (А) (1T1+2T1), (Б) (1T1+2T5) и (В) (1T5+2T5) и их дуплексов с РНК-мишенью. Условия: 25°C, длина волны возбуждения флуоресценции 345 нм, диапазон 360-600 нм, буфер (10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 100 мМ NaCl, 1 мМ Na₂ЭДТА), концентрация олигонуклеотидов 1·10⁻⁷ М.

Мы исследовали влияние длины и структуры линкеров 3'- и 5'-монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), компонентов тандемных зондов, на формирование эксимера при связывании зондов с РНК-мишенью. Были записаны спектры испускания флуоресценции всех 28 комбинаций 3'-меченных (*1T1*, *1T2*, *1T5* и *1T6*) и 5'-меченных (*2T1-2T7*) зондов в присутствии и отсутствии РНК-мишени. В полученных спектрах при гибридизации тандемных зондов с РНК-мишенью, кроме двух структурированных пиков мономера пирена, наблюдали появление широкой неструктурированной полосы испускания с максимумом при ~480-485 нм (Рис.2.25). Выяснилось, что длина линкеров оказывает значительное влияние на способность остатков пирена формировать эксимер, а именно наибольшая интенсивность эксимерной флуоресценции соответствовала комплексу зондов с относительно короткими линкерами с РНК-мишенью (например, дуплекс (*1T1+2T1*)-*RNA4*) (Табл.2.14).

Таблица 2.14. Отношение сигнал/шум при связывании тандемных зондов с модельной РНК-мишенью

Зонд ^а	Иллюстрация ^б	Отношение сигнал/шум ^в	Зонд ^а	Иллюстрация ^б	Отношение сигнал/шум ^в
<i>1T1+2T1</i>		29.1	<i>1T5+2T1</i>		3.1
<i>1T1+2T2</i>		33.6	<i>1T5+2T2</i>		4.2
<i>1T1+2T3</i>		16.0	<i>1T5+2T3</i>		1.8
<i>1T1+2T4</i>		7.2	<i>1T5+2T4</i>		2.0
<i>1T1+2T5</i>		9.7	<i>1T5+2T5</i>		3.5
<i>1T1+2T6</i>		12.7	<i>1T5+2T6</i>		1.6
<i>1T1+2T7</i>		15.4	<i>1T5+2T7</i>		3.8
<i>1T2+2T1</i>		8.0	<i>1T6+2T1</i>		4.9
<i>1T2+2T2</i>		5.1	<i>1T6+2T2</i>		5.1
<i>1T2+2T3</i>		2.9	<i>1T6+2T3</i>		1.6
<i>1T2+2T4</i>		2.0	<i>1T6+2T4</i>		2.2
<i>1T2+2T5</i>		5.6	<i>1T6+2T5</i>		2.3
<i>1T2+2T6</i>		2.3	<i>1T6+2T6</i>		3.9
<i>1T2+2T7</i>		4.7	<i>1T6+2T7</i>		3.8

^а Последовательности зондов и структуры всех пиренильных линкеров приведены на рисунке 2.17. ^б Зелеными, красными и черными линиями обозначены зонды *1Tx*, зонды *2Ty* и РНК-мишень, соотв. ^вСоотношение сигнал/шум было рассчитано с использованием следующего уравнения: $S/B = (I_{480}/I_{391})_{\text{тандемный зонд+РНК}} / (I_{480}/I_{391})_{\text{тандемный зонд}}$. Условия: 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА; длина волны возбуждения была 345 нм; концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.

Более того, мы обнаружили, что наибольшую роль играет именно длина линкера 3'-модифицированного компонента тандемного зонда, так как наибольшую интенсивность

эксимерной флуоресценции наблюдали для зондов, содержащих в качестве 3'-модифицированного компонента пиренильный конъюгат *IT1*, содержащий короткий линкер **L1**. Вероятно, такая длина линкера оптимальна для сближения пиренильного остатка в составе 3'-модифицированного компонента с остатком пирена, введенным в 5'-положение второго компонента; и наоборот, у остатков пирена, присоединенных к олигонуклеотиду посредством длинных гибких линкеров, значительно уменьшается вероятность сближения в пространстве и образования эксимера даже в тех случаях, когда линкеры имеют одинаковую или близкую длину. Однако стоит отметить, что какого-либо влияния природы линкера на поведение спектров флуоресценции не было обнаружено. Добавление некомплементарной РНК-мишени не вызывало каких-либо изменений в спектрах испускания флуоресценции тандемных зондов. Следует отметить, что в спектрах испускания тандемных зондов в отсутствие мишени не наблюдали эксимерной флуоресценции пирена, а значит, изменения флуоресценции на длине волны 480 нм являются следствием формирования комплекса тандемных зондов с мишенью.

Опираясь на полученные в данной части работы результаты об изменении флуоресценции тандемных зондов при гибридизации с РНК-мишенью можно сделать вывод, что необходимым условием появления эксимерной флуоресценции при гибридизации зонда с РНК является короткий линкер $-CH_2NH-$ между остатком пирена и олигонуклеотидом для 3'-компонента зонда.

Для того чтобы попытаться интерпретировать полученные результаты, мы построили молекулярно-динамическую модель дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью.

2.2.4. Анализ дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью методом МД

Для исследования ориентации пиренильных остатков и структурных особенностей дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью мы провели моделирование этих дуплексов методом МД в явной водной оболочке с использованием программного пакета AMBER12 [239] (совместно с к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым, ЛБМХ ИХБФМ СО РАН). Частичные заряды атомов были рассчитаны в программном пакете Gaussian 09 с использованием метода Хартри-Фока и набора базисных функций 6-31G* с оптимизацией структуры. Мы построили структуры дуплексов тандемных зондов, содержащих один остаток пирена в стыке, с РНК-мишенью, т.е. $(IT5+2T) \cdot RNA4$ и $(IT+2T5) \cdot RNA4$, а также дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью $(IT1+2T1) \cdot RNA4$, $(IT1+2T5) \cdot RNA4$ и $(IT5+2T5) \cdot RNA4$, содержащих два остатка пирена в стыке. Анализ 800 нс (10 запусков по 80 нс с разными начальными скоростями атомов) МД-траекторий для каждой структуры показал, что в течение МД-симуляций конформация трехкомпонентного дуплекса тандемных пирен-меченных зондов с РНК-мишенью близка к

оригинальной А-форме типичной для дуплексов РНК/РНК, однако, немного изогнута в месте ника (Рис.2.26).

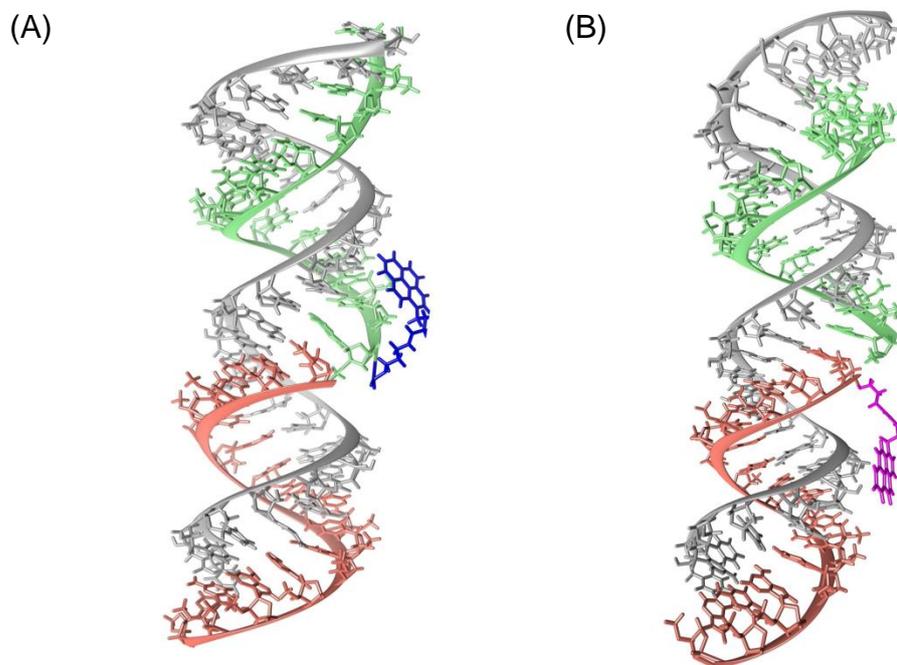


Рис. 2.26. Репрезентативные структуры дуплексов (А) $(1T5+2T) \cdot RNA4$ и (Б) $(1T+2T5) \cdot RNA4$. Олигонуклеотидные части $1T$, $2T$ и $RNA4$ представлены зеленым, оранжевым и серым цветом, соответственно. Пиренильные линкеры $3'-L5$ и $5'-L5$ представлены синим и розовым цветом, соответственно. Молекулы воды и ионы из буферного раствора удалены для упрощения представления.

На рисунке 2.26 представлена типичные МД-структуры дуплексов $(1T5+2T) \cdot RNA4$ и $(1T+2T5) \cdot RNA4$. Молекулярное моделирование дуплексов тандемных зондов, содержащих один остаток пирена, показало, что пиренильный остаток располагается в районе малой бороздки. В соответствии с полученными данными, 3'-концевой остаток пирена стремится разместиться в малой бороздке ближайшего поворота спирали, в то время как 5'-концевой остаток стремится взаимодействовать с малой предыдущего поворота спирали (Рис. 2.26). Данный результат был довольно неожиданным, потому что, основываясь на результатах термической денатурации этих дуплексов, мы предполагали, что пирен взаимодействует с соседними азотистыми основаниями.

В случае трех-компонентных дуплексов $(IT1+2T1)\cdot RNA4$, $(IT1+2T5)\cdot RNA4$ и $(IT5+2T5)\cdot RNA4$ с двумя остатками пирена, для того, чтобы исследовать динамику ассоциации и диссоциации пиренильных остатков, мы проследили два варианта эволюции дуплексов, т.е. мы запустили МД-симуляции: начиная с разведенных пиренильных остатков в стыке дуплекса (вариант 1) и начиная МД-симуляции с заранее сформированного пиренильного димера (вариант 2). Для оценки эффективности образования пиренильного димера, т.е. перекрывания пиренильных остатков вдоль всей МД-траектории, мы вычислили распределение суммарной доступной для молекул растворителя площади поверхности двух остатков пирена с их линкерами (площадь поверхности Конноли [240]). Для этого, каждый из ~80000 снимков был проанализирован в программе crrtraj пакета программ Amber12 при радиусе пробы равной 1.4 Å. Были получены типичные зависимости суммарной площади поверхности двух пиренильных остатков, доступные для растворителя, от времени МД-симуляций. Основываясь на полученных данных, были построены распределения вероятностей и соответствующие репрезентативные структуры дуплексов (Рис. 2.27).

Мы сравнили полученные значения площади поверхности с максимумом суммарной площади двух остатков пирена с соответствующими линкерами ($512\pm 15 \text{ \AA}^2$, $637\pm 15 \text{ \AA}^2$ и $759\pm 15 \text{ \AA}^2$, соответственно). Основываясь на полученных структурах, площадь поверхности пиренильных остатков в дуплексах тандемных зондов с РНК-мишенью равную $430\pm 30 \text{ \AA}^2$, $540\pm 30 \text{ \AA}^2$ и $600\pm 30 \text{ \AA}^2$ для дуплексов $(IT1+2T1)\cdot RNA4$, $(IT1+2T5)\cdot RNA4$ и $(IT5+2T5)\cdot RNA4$, соответственно, мы отнесли к димеру остатков пирена. Было обнаружено, что длина и конформационная подвижность линкеров **L1** и **L5** позволяет формировать димер пирена в обоих дуплексах $(IT1+2T5)\cdot RNA4$ и $(IT5+2T5)\cdot RNA4$.

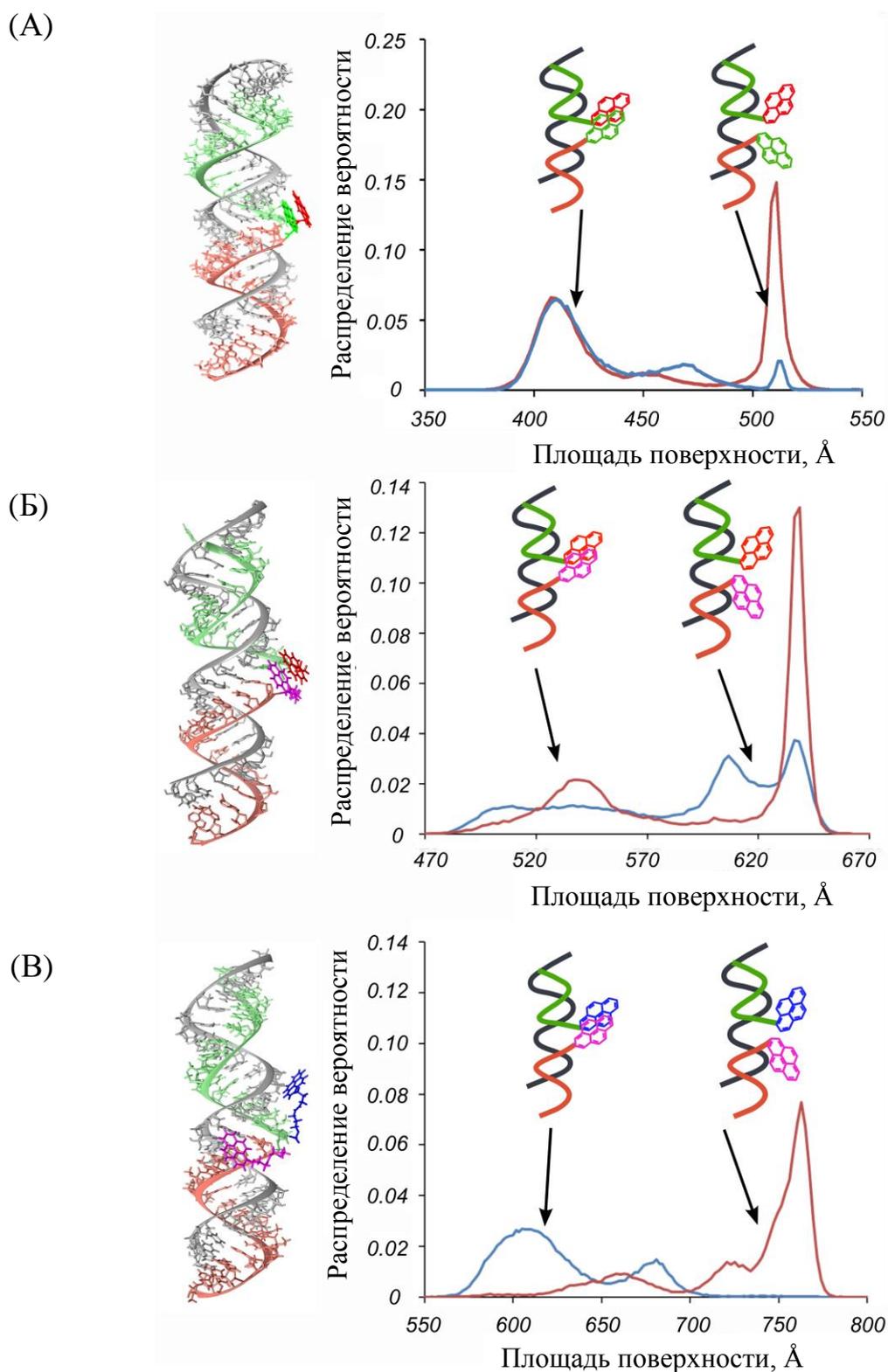


Рис. 2.27. Репрезентативные структуры и распределения вероятностей суммарной площади поверхности доступной для растворителя двух остатков пирена (А) $(1T1+2T1)\cdot RNA4$, (Б) $(1T1+2T5)\cdot RNA4$ и (В) $(1T5+2T5)\cdot RNA4$. Синие и красные линии на графике соответствуют распределению, полученному при начальном положении остатков пирена в виде димера и в разведенном состоянии, соответственно. Олигонуклеотидные части $1T$, $2T$ и $RNA4$ представлены зеленым, оранжевым и серым цветом, соответственно. Пиренильные линкеры $3'\text{-L1}$, $3'\text{-L5}$, $5'\text{-L1}$ и $5'\text{-L5}$ представлены красным, синим, зеленым и розовым цветом, соответственно. Молекулы воды и ионы из буферного раствора пропущены для упрощения представления.

Анализ МД-траекторий дуплексов $(1T1+2T1) \cdot RNA4$ и $(1T1+2T5) \cdot RNA4$ показал, что формирование и распад пиренового димера может происходить часто при обоих начальных условиях (вариант 1 и 2) (Рис. 2.27А,Б). Вероятно, длина линкера **L1** слишком короткая, что не дает возможности остатку пирена взаимодействовать с бороздкой дуплекса.

Анализ МД-траекторий дуплекса $(1T5+2T5) \cdot RNA4$ показал, что наиболее вероятная конформация пиренильных остатков сильно зависит от начальных условий моделирования, причем, это не зависело от начальных скоростей атомов. Разнесение пиренильных остатков в начале (вариант 1) приводит к взаимодействию остатков пирена с малой бороздкой дуплекса, также как и в случаях дуплексов $(1T5+2T) \cdot RNA4$ и $(1T+2T5) \cdot RNA4$. Однако, если димер сформирован (вариант 2) в начальной структуре дуплекса $(1T5+2T5) \cdot RNA4$, то он остается стабильным вдоль всей МД-траектории (Рис. 2.27 В). Так как вероятность ассоциации пиренильных остатков в димер драматически низкая, мы считаем, что данными по диссоциации димера пирена в дуплексе $(1T5+2T5) \cdot RNA4$ можно пренебречь. Таким образом, полученные МД-траектории и распределения вероятностей согласуются с наблюдаемыми спектрами флуоресценции и поглощения дуплексов тандемных зондов с РНК-мишенью.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что: 1) в стыке дуплекса тандемных зондов с РНК-мишенью пиренильные остатки располагаются в районе малой бороздки дуплекса, 2) так как образующиеся дуплексы А-формы достаточно плотные, пиренильные остатки не могут интеркалировать внутрь дуплекса, 3) в случае дуплексов $(1T1+2T1) \cdot RNA4$, $(1T1+2T5) \cdot RNA4$ и $(1T5+2T5) \cdot RNA4$ пиренильные остатки могут формировать димер и вероятность образования димера зависит от длины линкера между пиреном и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидом).

2.2.5. Визуализация внутриклеточной РНК-мишени с помощью тандемных зондов

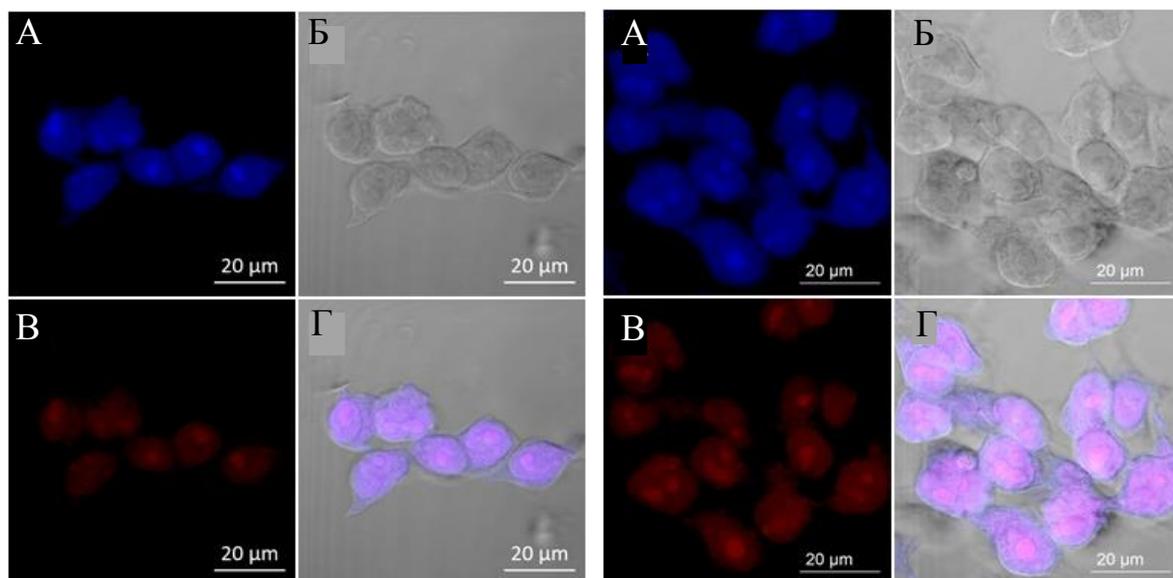
Демонстрацию возможности полученных тандемных зондов оптимального строения проводили с использованием клеточной линии НЕК293 Phoenix (эмбриональная клеточная линия почек человека) методом гибридизации *in situ* (совместно с к.б.н. В.С. Фишманом, ИЦИГ СО РАН).

В качестве мишени для тандемных зондов в данной работе был выбран фрагмент 28S рибосомальной РНК человека (GenBank ID 337381, 2326-2357 нт) или мыши (GenBank ID 53988, 2104-2135 нт), которая нарабатывается в больших количествах в клетках. Клетки линии НЕК293 Phoenix выращивали на покрытых желатином

покровных стеклах, затем фиксировали параформальдегидом и проводили гибридизацию с тандемными зондами. Визуализацию флуоресцентного отклика проводили с использованием лазерного конфокального микроскопа (Рис. 2.28). В случае тандемных зондов оптимального строения (*1T1+2T1*) или (*1T1+2T4*), демонстрирующих высокую интенсивность эксимерной флуоресценции при связывании с РНК-мишенью, как и ожидалось, мы наблюдали интенсивное испускание флуоресценции при 450-495 нм в ядрышках и цитоплазме (Рис. 2.28, панели 1,2) [219]. Обработка фиксированных клеток зондами с низким соотношением сигнал/шум, например (*1T2+2T6*) (Табл. 2.14), не приводила к появлению флуоресцентного сигнала (панель 3). Мы не наблюдали фоновой флуоресценции или автофлуоресценции фиксированных клеток при отсутствии зондов. Для подтверждения специфического связывания тандемных зондов с РНК-мишенью, фиксированные клетки обрабатывали РНКазой А, промывали и затем инкубировали с тандемными зондами как в [89] с небольшими модификациями.

1. Зонды (*1T1+2T1*), U3-Cy3

2. Зонды (*1T1+2T4*), U3-Cy3



3. Зонды (*1T2+2T6*), U3-Cy3

4. Клетки, обработанные РНКазой А
Зонды (*1T1+2T4*), U3-Cy3

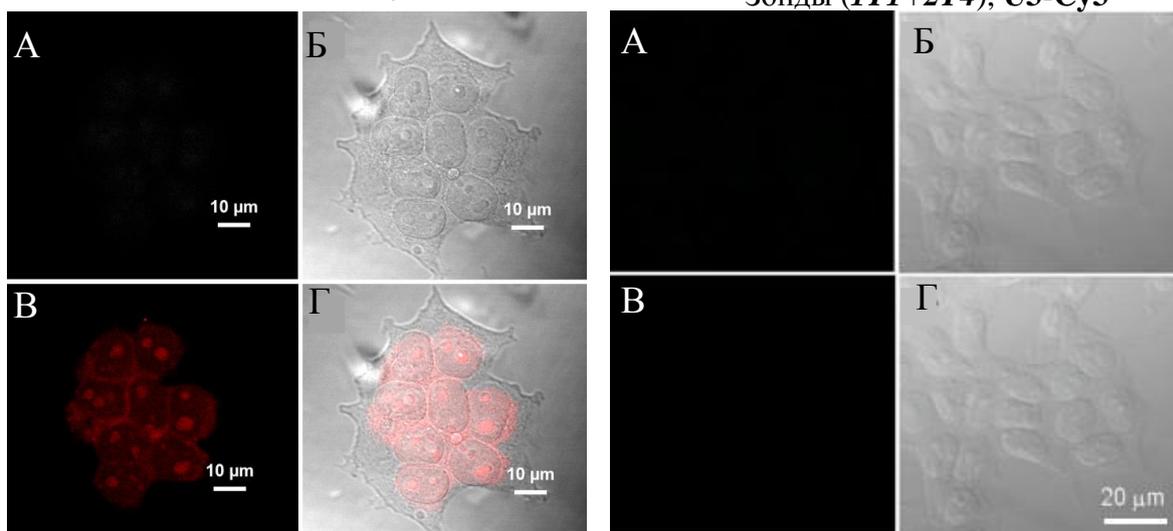


Рис. 2.28. Визуализация внутриклеточной 28S рибосомальной РНК с использованием tandemных пирен-меченных зондов (*1T1+2T1*), (*1T1+2T4*) и (*1T2+2T6*) (панели 1-3, соотв.) в фиксированных клетках линии HEK293 Phoenix. В качестве контроля был использован Cy3-меченный зонд U3-Cy3 (5'-Cy3-m(GGCUUCACGCUCAGG)), связывающийся с U3 мяРНК. А – канал эксимерной флуоресценции пирена (длина волны возбуждения - 405 нм, детекцию флуоресцентного отклика проводили в диапазоне длин волн 450-495 нм), Б – фазовый контраст, В – канал флуоресценции Cy3 (длина волны возбуждения - 514 нм, детекцию флуоресцентного отклика проводили в диапазоне длин волн 570-630 нм), Г – объединенный канал.

Как показано на рисунке 2.28 (панель 4), после обработки фиксированных клеток РНКазой А сигнал в канале эксимерной флуоресценции пирена отсутствует.

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

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

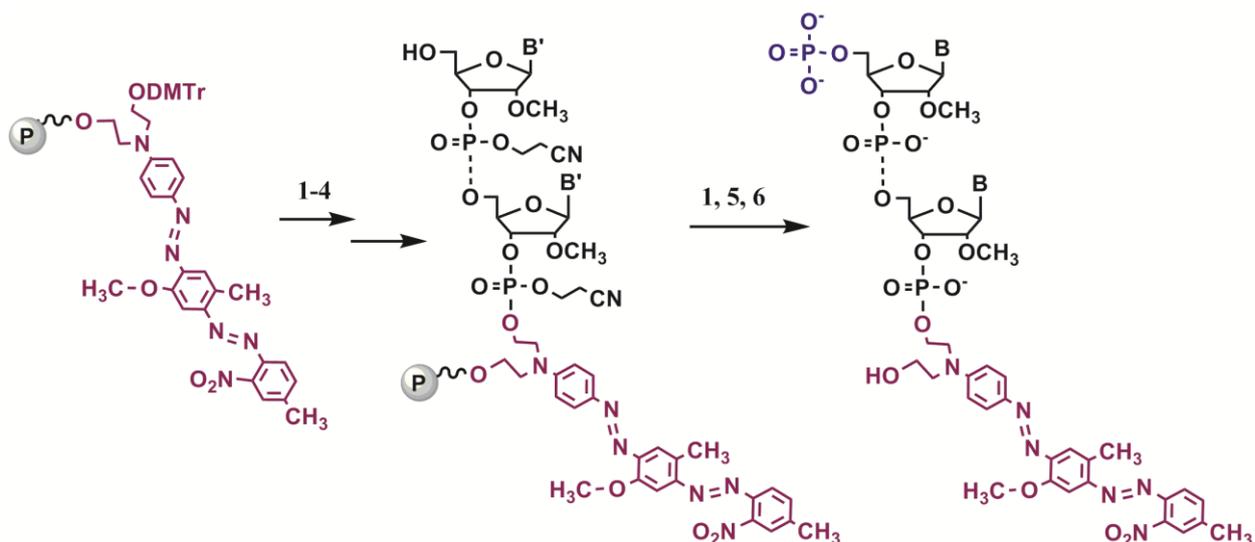
Одним из удачных примеров создания зондов на основе нуклеиновых кислот являются так называемые «молекулярные маяки» (МВ - molecular beacon) [241]. В настоящее время предложено большое количество таких зондов, обладающих различной структурой и механизмами действия [242–245]. Классическим примером зондов такого типа являются олигонуклеотиды, образующие структуру типа «стебель-петля» или «шпилька» (stem-and-loop structure) и несущие флуорофор на одном из концов и тушитель флуоресценции - на другом. В отсутствие мишени флуорофор и тушитель флуоресценции пространственно сближены, и происходит тушение флуоресценции. При связывании зондов с мишенью, благодаря конформационным изменениям, флуорофор и тушитель удаляются друг от друга, что сопровождается появлением флуоресцентного сигнала.

Перспективным направлением в области конструирования «молекулярных маяков» является создание структур, содержащих несколько флуорофоров. К таким зондам относят, в частности, эксимер-образующие пиренсодержащие «молекулярные маяки» [60,157,190,241]. При дизайне новых флуоресцентных зондов типа «молекулярный маяк» для детекции РНК в качестве основы мы выбрали олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), так как ранее было показано, что зонды на основе 2'-О-метил РНК являются более эффективными инструментами детекции РНК по сравнению с аналогичными конструкциями на основе олигодезоксирибонуклеотидов (см., например, [246–249]). В качестве флуорофора нами была использована биспиренильная группировка, способная формировать эксимеры (т.е. «возбужденные димеры») с появлением в спектре испускания флуоресценции пирена новой широкой полосы с максимумом в районе 480 нм. ВНQ1 (Black Hole Quencher 1) был выбран в качестве тушителя флуоресценции, так как полоса поглощения этого хромофора (~450-600 нм, λ_{\max} 534 нм) перекрывается с областью испускания эксимерной флуоресценции пирена (~420-560 нм), обеспечивая её эффективное тушение. РНК-мишенью служили участки 28S рибосомальной РНК человека (остатки 2319-2361) и мыши (остатки 2096-2138) (оба фрагмента длиной 43 нт имеют одинаковую последовательность).

2.3.1. Синтез 5'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих тушитель ВНQ1 на 3'-конце

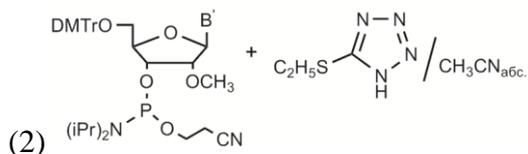
Серия исходных 5'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) была синтезирована автоматическим твердофазным фосфитамидным методом. Для введения остатка ВНQ1 на 3'-конец олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) использовали полимерный носитель, модифицированный ВНQ1 (Схема 2.7).

Схема 2.7



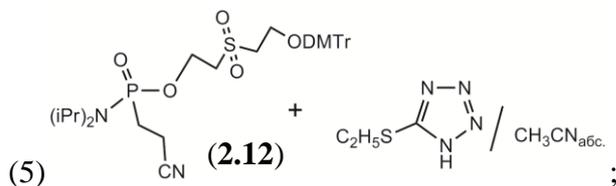
P^{\sim} : модифицированное стекло с контролируемым размером пор (CPG 500), (B) B'=(не)защищенное гетероциклическое основание.

(1) 3% $\text{Cl}_2\text{CHCOOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$;



(3) N-MeIm в THF, $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ и 2,6-лутидин в THF;

(4) I_2 в THF:Py: H_2O (75:20:2);

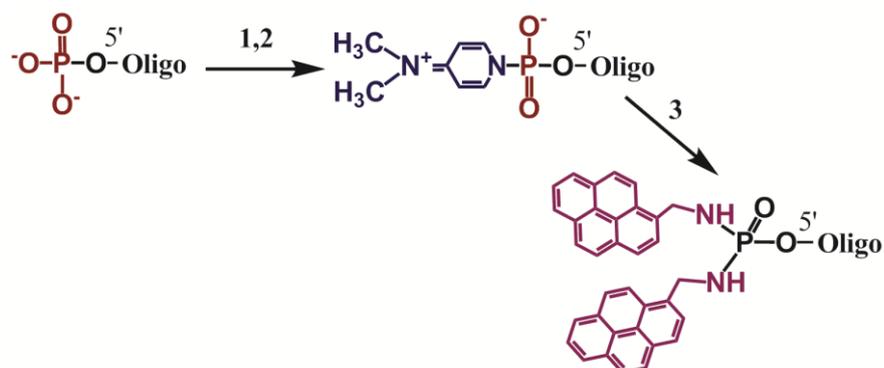


(6) 0.05 M K_2CO_3 в метаноле (25 °C, 16 ч).

После окончания синтеза финальное деблокирование защитных групп и отделение полученного олигонуклеотида от полимерного носителя проводили в ультра мягких условиях (см. раздел 3.3.12).

Получение 5'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) проводили как описано ранее в работах [18,155] (Схема 2.8).

Схема 2.8



(1) Трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид, DMSO абс.; (2) 4-*N,N'*-диметил-аминопиридин, DMSO абс., 56 °С, 15 мин; (3) 1-пиренилметиламин, (C₂H₅)₃N, DMSO абс., 56 °С, 2 ч.

Полученные реакционные смеси анализировали методом аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях (Рис. 2.29). Пиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) во всех случаях обладали заметно меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с исходными 5'-фосфорилированными олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидами)-предшественниками (Рис. 2.30). Во всех случаях степень превращения исходных 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов в пиренильные конъюгаты была не менее 80%. Выделение всех синтезированных 5'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) из реакционных смесей проводили методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующим обессоливанием и осаждением в виде литиевых солей. Выходы синтезированных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) составили 20.0-54.7 % (Табл.2.15).

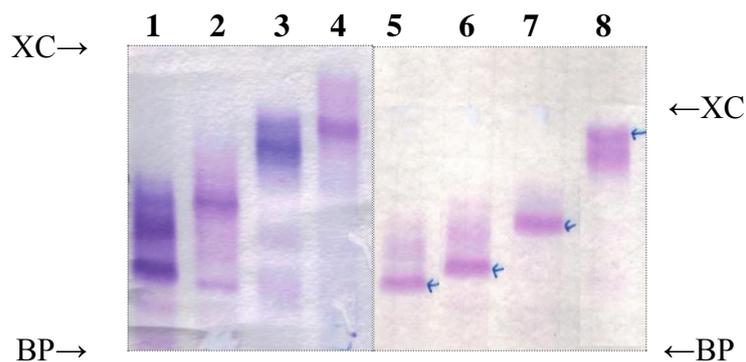


Рис. 2.29. Электрофореграмма реакционных смесей 5'-биспирен-модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*MB1*), (*MB4*) (дорожки 2, 4, соотв.) и соответствующие 5'-фосфат-содержащие контроли (дорожки 1, 3, соотв.) и выделенных (*MB1*), (*MB2*), (*MB3*) и (*MB4*) (дорожки 5-8, соотв.).

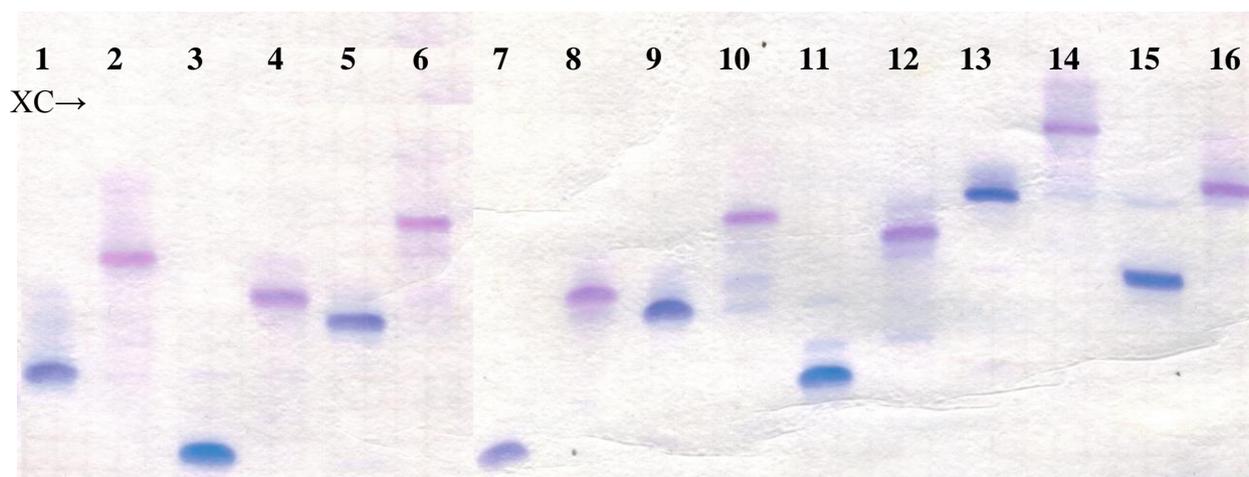
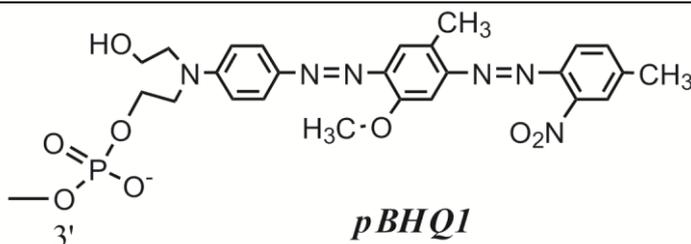
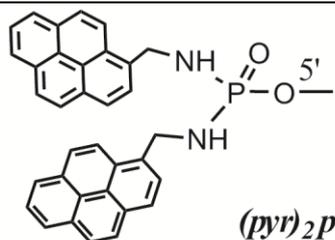


Рис. 2.30. Электрофореграмма выделенных 5'-биспирен-модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (*H1*), (*L1*), (*H2*), (*L2*), (*H3*), (*L3*), (*H4*), (*L4*) (четные дорожки, соотв.) и соответствующие 5'-фосфат-содержащие контроли (нечетные дорожки, соотв.).

Структуру конъюгатов подтверждали методами MALDI-TOF-масс-спектрометрии, а также УФ- и флуоресцентной спектроскопии (Табл. 2.15).

Таблица 2.15. Последовательности и характеристики синтезированных 5'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов)

Обозначение	Конъюгат *	Выход, ^{2*} %	Молекулярная масса	
			Экспериментальная, ^{3*} <i>m/z</i>	Расчетная, [M+H] ⁺
MB1	<i>(pyr)₂p</i> <u>CCACCAAGAUCUGCAGGUGG</u> <i>pBHQ1</i>	20.7	-	7652.4
H1	<i>(pyr)₂p</i> <u>CCACCAAGAUCUGCAGGUGG</u>	39.3	7195.2	7193.4
LP1	<i>(pyr)₂p</i> <u>CCACCAAGAUCUGCA</u>	42.0	5438.0	5436.3
MB2	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCCACCAAGAUCUGCAGUGGC</u> <i>pBHQ1</i>	20.0	-	7971.6
H2	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCCACCAAGAUCUGCAGUGGC</u>	37.3	7513.8	7512.6
LP2	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCCACCAAGAUCUGCA</u>	54.7	5799.8	5801.5
MB3	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCUCCACCAAGAUCUGCAGGAGC</u> <i>pBHQ1</i>	22.7	-	8634.1
H3	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCUCCACCAAGAUCUGCAGGAGC</u>	36.0	8175.9	8175.1
LP3	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCUCCACCAAGAUCUGCA</u>	53.3	6437.2	6434.9
MB4	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCGACUACCACCAAGAUCUGCAGGAGC</u> <i>pBHQ1</i>	20.7	-	9935.9
H4	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCGACUACCACCAAGAUCUGCAGGAGC</u>	32.7	9478.8	9476.9
LP4	<i>(pyr)₂p</i> <u>GCGACUACCACCAAGAUCUGCA</u>	50.0	7802.1	7799.8



* Обозначение m в последовательностях олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) опущено; *(pyr)₂p* – биспиренилметилфосфодиамидная группировка; *pBHQ1* – тушитель флуоресценции; нуклеотиды, образующие «стебель», обозначены подчеркиванием снизу.

^{2*} Выход после выделения гель-электрофорезом в расчете на стадию конъюгации с двумя остатками пирена.

^{3*} По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Синтезированные зонды типа «молекулярный маяк» **MB1-MB4** различались: 1) длиной свисающего одноцепочечного участка (0, 1 и 3 нт), образующегося при гибридизации зонда с мишенью и несущего два остатка пирена, 2) длиной участка для гибридизации с РНК-мишенью (15 и 19 нт) и 3) количеством пар нуклеотидов, образующих «стебель» (5 и 6 п.о.). Для сравнительного исследования физико-химических свойств созданных зондов типа «молекулярный маяк» были синтезированы две серии 5'-биспиренмодифицированных зондов. Первая серия представляла собой зонды **H1-H4** без тушителя, а вторая – укороченные с 3'-конца зонды **LP1-LP4**, которые не содержали тушителя и не образовывали вторичной структуры «стебель-петля» (Рис. 2.31, Табл. 2.15).

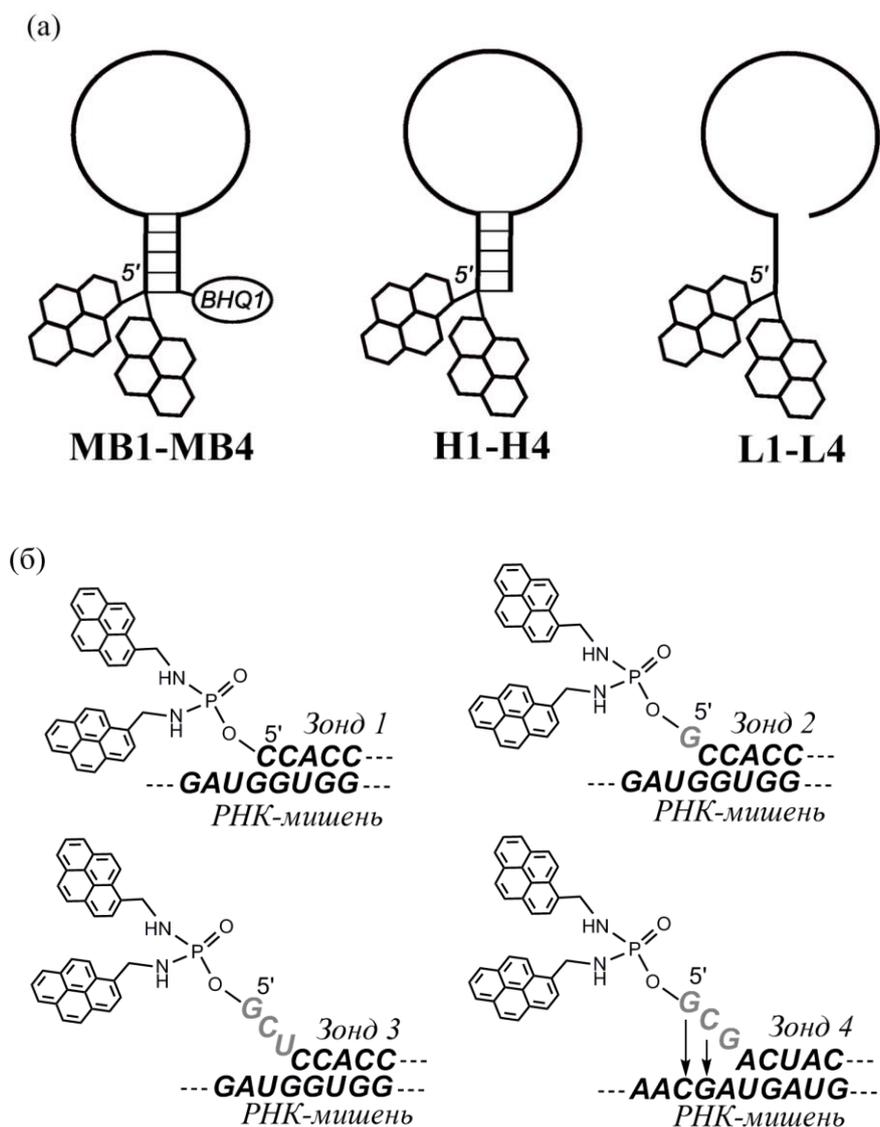


Рис. 2.31. Структуры зондов типа «молекулярный маяк» и их комплексов с РНК-мишенью (*RNA4*). (а) Схематическое представление синтезированных зондов *MB1-MB4*, *H1-H4* и *LP1-LP4*. (б) Фрагменты структуры комплексов зондов с РНК-мишенью. Нуклеотиды свисающего одноцепочечного участка изображены серым цветом. Последовательности зондов приведены в таблице 2.15.

2.3.2. Спектральные свойства 5'-биспиренильных зондов и их дуплексов с РНК

На следующем этапе проводили сравнительное изучение спектральных свойств зондов типа «молекулярный маяк» *MB1-MB4* и синтезированных 5'-биспиренильных зондов двух типов зонды *H1-H4* и *LP1-LP4*, не содержащих тушителя на 3'-конце.

В электронных спектрах поглощения конъюгатов наблюдали пики при 260 нм, соответствующие поглощению олигонуклеотидной части, два характерных пика при 332 и 347 нм, соответствующие поглощению пирена, а также широкую неструктурированную полосу в

области 400-600 нм. На рисунке 2.32 представлен типичный спектр поглощения 5'-биспиренильного конъюгата (*MB1*).

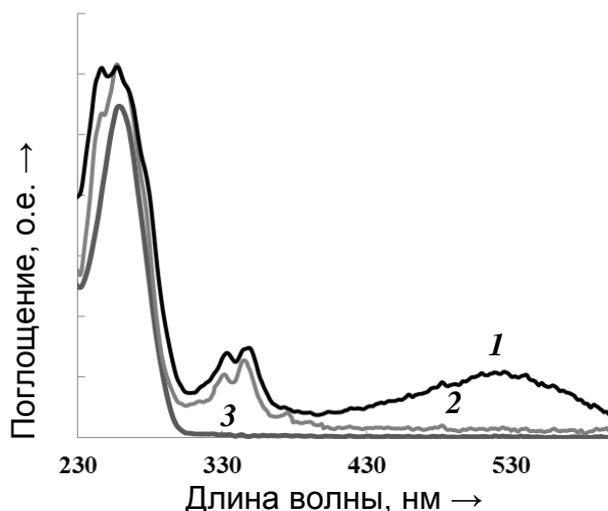


Рис. 2.32. Типичные УФ/видимые спектры поглощения растворов 5'-биспиренильного зонда (*MB1*), содержащего тушитель *BHQ1* на 3'-конце, зонда (*H1*) и соответствующего немодифицированного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) контроля (спектры 1-3, соотв.). Концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ. Спектры записаны в буфере, содержащем 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, pH 7.4, 1 мМ Na₂ЭДТА при 25 °С.

В спектрах испускания флуоресценции зондов *MB1-MB4* не наблюдали пика эксимерной флуоресценции пирена, а интенсивность двух пиков с максимумами при 378 и 391 нм (колебательные полосы I и III мономера пирена [16]) была пренебрежимо мала, при этом зонды *H1-H4*, *LP1-LP4*, не содержащие тушителя флуоресценции, демонстрировали высокую интенсивность мономерной и эксимерной флуоресценции (Рис. 2.33). Полученные результаты свидетельствуют об эффективном тушении мономерной и эксимерной флуоресценции пирена в присутствии *BHQ1* в случае зондов *MB1-MB4*.

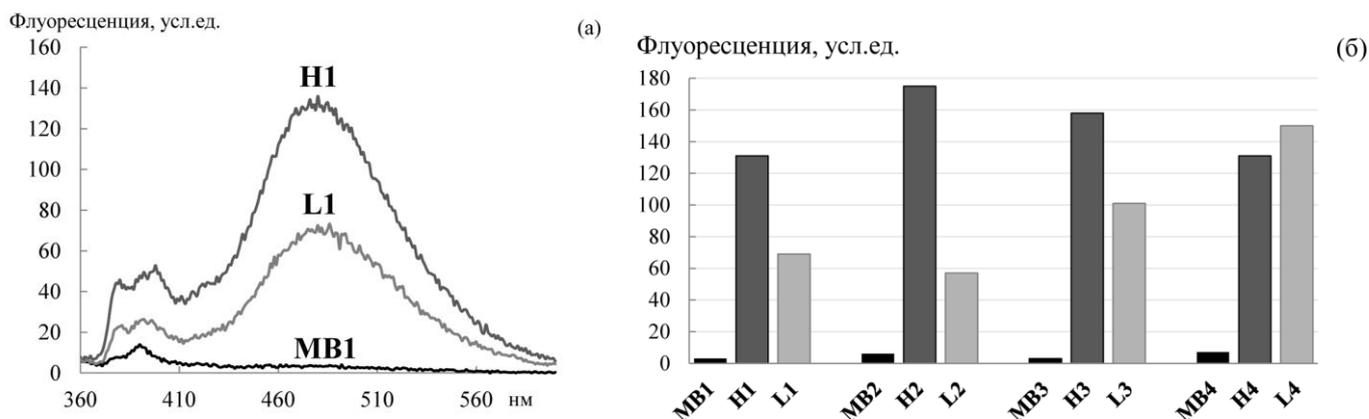


Рис. 2.33. Флуоресцентные свойства зондов. (а) Спектры флуоресценции 5'-биспиренильных зондов *MB1*, *H1* и *L1*. (б) Интенсивность эксимерной флуоресценции (длина волны 480 нм) зондов *MB1-MB4*, *H1-H4* и *LP1-LP4*. Условия: 25°С, длина волны возбуждения флуоресценции 345 нм, диапазон 360-600 нм, буфер 10 мМ какодилат натрия (pH 7.4), 100 мМ NaCl, 1 мМ Na₂EDTA, концентрация 5'-биспиренильных зондов и РНК-мишени $1 \cdot 10^{-6}$ М.

При гибридизации 5'-биспиренильных зондов **MB1-MB4** с РНК-мишенью наблюдали увеличение интенсивности испускания флуоресценции пирена. Во всех случаях происходило значительное увеличение мономерной флуоресценции пирена, при этом изменения эксимерной флуоресценции зависели от структуры комплекса зонд/РНК-мишень (Рис. 2.34 и 2.35).

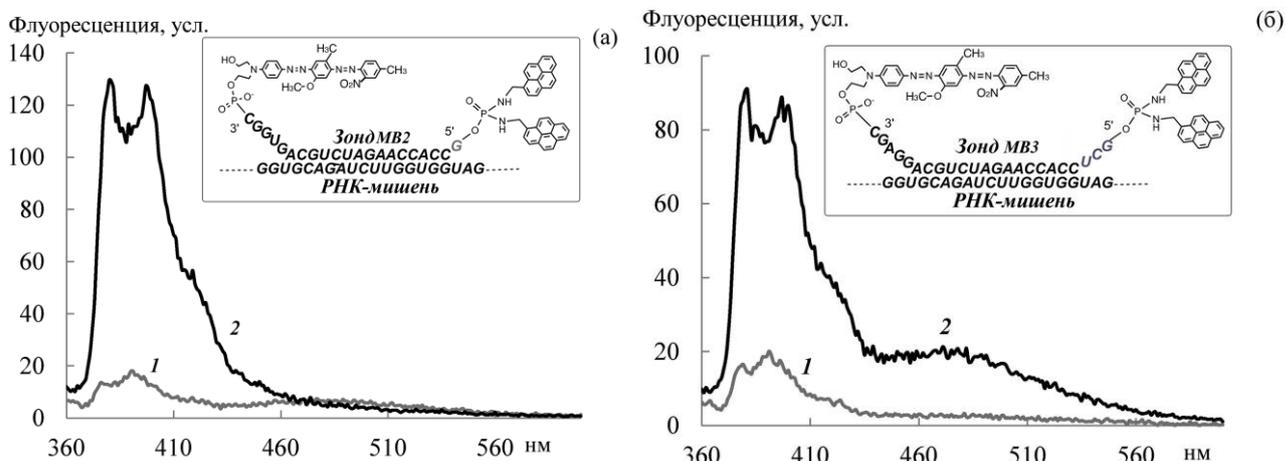


Рис. 2.34. Изменение спектров флуоресценции зондов типа «молекулярный маяк» **MB2** и **MB3** при гибридизации с РНК-мишенью. (а) Спектр **1** – зонд **MB2**, спектр **2** – дуплекс (**MB2** + РНК); (б) спектр **1** – зонд **MB3**, спектр **2** – дуплекс (**MB3** + РНК). Условия см. подпись к рисунку 2.33.

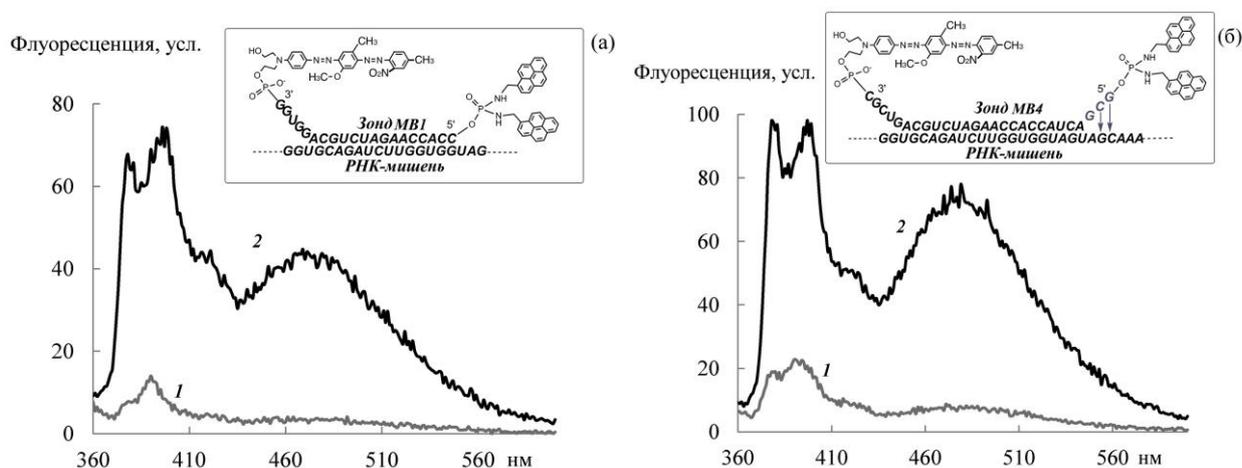


Рис. 2.35. Изменение спектров флуоресценции зондов типа «молекулярный маяк» **MB1** и **MB4** при гибридизации с РНК-мишенью. (а) Спектр **1** – зонд **MB1**, спектр **2** – дуплекс (**MB1** + РНК); (б) спектр **1** – зонд **MB4**, спектр **2** – дуплекс (**MB4** + РНК). Условия см. подпись к рисунку 2.33.

При связывании 5'-биспиренильных зондов **H1-H4**, **LP1-LP4** с 43-звенной РНК-мишенью во всех случаях наблюдали увеличение мономерной и уменьшение эксимерной флуоресценции пирена (Рис. 2.36).

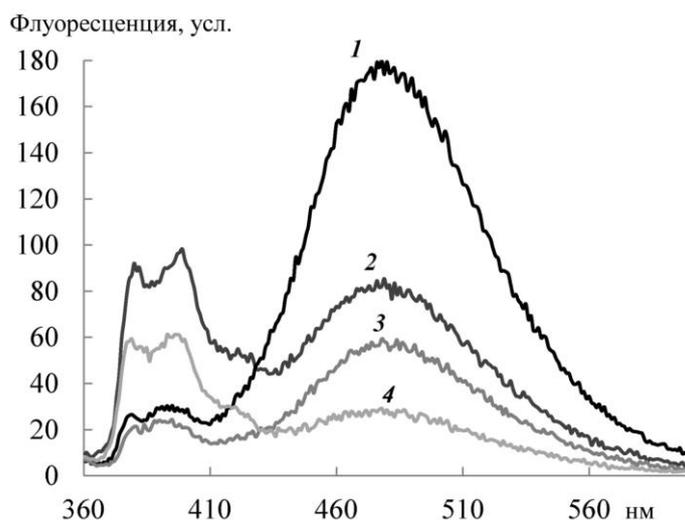


Рис. 2.36. Изменение спектров флуоресценции зондов **H2** и **LP2** при гибридизации с РНК-мишенью. Спектр **1** – зонд **H2**, спектр **2** – дуплекс (**H2** + РНК), спектр **3** – зонд **LP2**, спектр **4** – дуплекс (**LP2** + РНК). Условия см. подпись к рисунку 2.33.

При связывании «молекулярных маяков» **MB2** и **MB3** с РНК-мишенью образовывались комплексы, в которых 5'-биспиренильная группировка располагалась на «свисающем» конце зонда и была удалена от дуплекса зонд/РНК-мишень на 1 и 3 нт, соответственно. В этих случаях практически не происходило увеличения эксимерной флуоресценции пирена (Рис. 2.34).

Связывание с РНК-мишенью зонда **MB1**, 5'-биспиренилметилфосфодиамидная группа в котором находится в непосредственной близости к дуплексу, или зонда **MB4**, в котором расстояние от 5'-биспиренильной группировки до дуплекса составляло 3 нт, приводило к значительному увеличению эксимерной флуоресценции пирена (Рис. 2.35). Появление интенсивной эксимерной флуоресценции при связывании зонда **MB4** с РНК-мишенью (в отличие от зондов **MB2** и **MB3**, имеющих схожее строение), вероятно, связано с тем, что 5'-«свисающий» конец зонда **MB4** частично комплементарен мишени и при гибридизации происходит образование двух С·G-пар, в результате чего 5'-биспиренильная группировка, как и в случае зонда **MB1**, оказывается расположенной в непосредственной близости от дуплекса. Образующийся в структуре комплекса мисматч G·A, видимо, не препятствует гибридизации крайних 5'-нуклеотидов зонда с РНК и сближению 5'-биспиренильной группировки с дуплексом (Рис. 2.35б). Для того чтобы оценить эффективность тушения флуоресценции 5'-биспиренильных группировок тушителем ВНQ1, были определены квантовые выходы флуоресценции (Φ_F) синтезированных зондов **MB1-MB4** и их дуплексов с модельной РНК-мишенью, в сравнении с зондами **H1-H4**. Расчет квантовых выходов проводили относительно антрацена в циклогексане ($\Phi_F = 0.36$) и 9,10-дифенилантрацена в циклогексане ($\Phi_F = 1.00$) как описано в работе [6]. Так как зонды **MB1-MB4** планируется в дальнейшем использовать для детекции РНК-мишеней в присутствии кислорода воздуха, образцы не дегазировали.

Таблица 2.16. Флуоресцентные свойства синтезированных зондов

Обозначение	Квантовый выход, ^{1*} %		Соотношение сигнал/шум ^{2*}
	Зонд	Зонд+РНК	
<i>MB1</i>	3	6.2	12.4
<i>H1</i>	31.9	17.1	0.8
<i>MB2</i>	1.1	10.9	1.2
<i>H2</i>	64.0	25.9	0.5
<i>MB3</i>	2.0	10.2	7.2
<i>H3</i>	70.4	16.7	0.4
<i>MB4</i>	2.1	16.5	9.4
<i>H4</i>	60.0	28.0	0.5

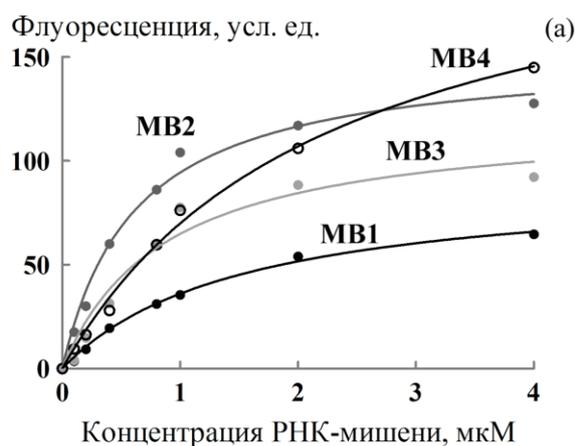
^{1*} Квантовый выход испускания флуоресценции (при t=25°C) 5'-биспиренильных зондов различных типов в отсутствие и в присутствии модельной РНК-мишени.

^{2*} Соотношение сигнал/шум рассчитано как соотношение интегралов флуоресценции зонда в присутствии РНК-мишени (в диапазоне 450-495 нм) и зонда в отсутствие РНК-мишени.

Квантовые выходы флуоресценции «молекулярных маяков» ***MB1-MB4*** находились в диапазоне 1.1-2.2 % (Табл. 2.16), при этом квантовые выходы флуоресценции дуплексов этих зондов с РНК-мишенью составили 6.2-16.5 %. Квантовые выходы флуоресценции 5'-биспиренильных зондов ***H1-H4*** были в диапазоне 31.9-70.4 %, а их дуплексов с РНК-мишенью - 16.7-28.0%. Полученные результаты свидетельствуют об эффективном тушении флуоресценции пирена тушителем ВНQ1.

2.3.3. Исследование связывания 5'-биспиренильных зондов типа «молекулярный маяк» с РНК-мишенью

Процесс гибридизации «молекулярных маяков» ***MB1-MB4*** с модельной РНК-мишенью изучали методом флуориметрического титрования, основанным на изменении интенсивности мономерной флуоресценции этих зондов при образовании комплексов с РНК (Рис. 2.37). При гибридизации 5'-биспиренильных конъюгатов ***MB1-MB4*** с РНК-мишенью (***RNA4***), добавляемой в повышающихся концентрациях, происходили характерные изменения мономерной и эксимерной флуоресценции зондов. Ниже представлены типичные зависимости изменения мономерной флуоресценции от концентрации РНК-мишени, полученные при титровании 5'-биспиренильных зондов ***MB1-MB4*** комплементарной РНК-мишенью (Рис. 2.37).



(б)

Конъюгат	K_d , М
MB1	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$
MB2	$(6.2 \pm 0.9) \cdot 10^{-7}$
MB3	$(8.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-7}$
MB4	$(2.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}$

Рис. 2.37. Связывание зондов типа «молекулярный маяк» с РНК-мишенью. (а) Зависимость интенсивности мономерной флуоресценции зондов **MB1-MB4** (380 нм) от концентрации 43-звенной РНК-мишени (**RNA4**). (б) Кажущиеся константы диссоциации комплексов зондов **MB1-MB4** с РНК-мишенью.

Константы диссоциации комплексов **RNA4** со всеми зондами были сопоставимы и составляли от $(6.2 \pm 0.9) \cdot 10^{-7}$ до $(2.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}$ М. Зависимости значений констант от структуры зондов выявить не удалось.

Был рассчитан предел определения РНК-мишени, т.е. её концентрация, при которой происходит увеличение интенсивности эксимерной флуоресценции зонда при гибридизации более чем в три раза по сравнению со средним отклонением шумового сигнала [236]. Минимальная концентрация модельной РНК-мишени, при которой её возможно детектировать при выбранных условиях гибридизации созданными нами 5'-биспиренильными зондами типа «молекулярный маяк», составила $2 \cdot 10^{-7}$ М для зонда **MB1** и $1 \cdot 10^{-7}$ М для зонда **MB4**.

2.3.4. Визуализация внутриклеточной РНК-мишени с помощью зондов типа «молекулярный маяк»

Для демонстрации возможности использования предложенных в работе зондов для визуализации внутриклеточной 28S рРНК методом гибридизации *in situ* нами были выбраны «молекулярные маяки» с максимальным соотношением сигнал/шум **MB1** и **MB4** (Табл. 2.16). Визуализацию РНК осуществляли в клетках линии HEK293 Phoenix (совместно с к.б.н. В.С. Фишманом, ИЦИГ СО РАН). Клетки выращивали на покрытых желатином покровных стеклах, затем фиксировали параформальдегидом и проводили гибридизацию с зондами **MB1** и **MB4** (см. описание в главе 2.2.5). При регистрации флуоресцентного отклика мы наблюдали интенсивное испускание эксимерной флуоресценции пирена на длинах волн 450-495 нм в ядрышках и цитоплазме (Рис. 2.38 а,б) [219], что подтверждает возможность визуализации 28S рРНК в фиксированных клетках с использованием разработанных зондов.

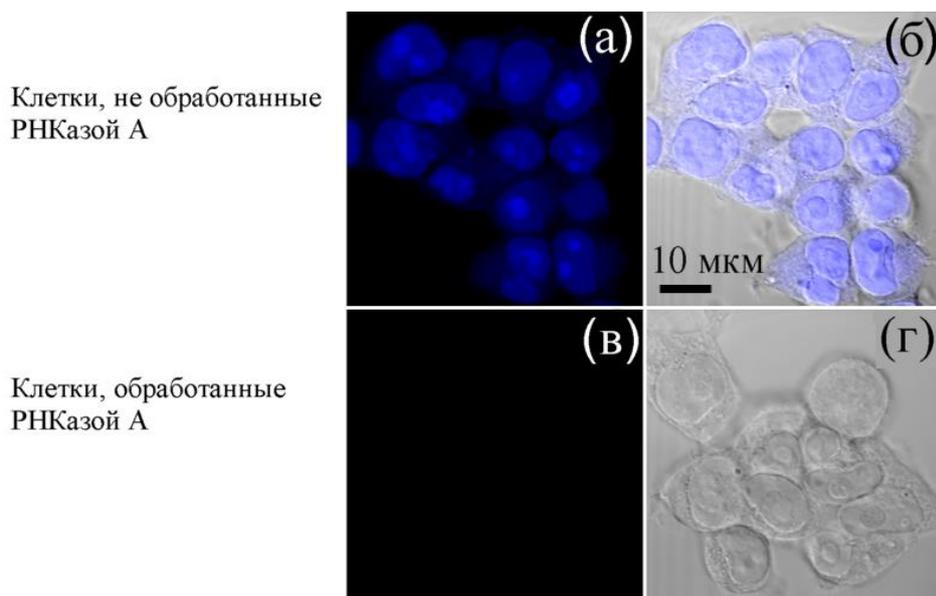


Рис. 2.38. Визуализация внутриклеточной 28S рРНК с использованием 5'-биспиренильного зонда типа «молекулярный маяк» *МВ1* в фиксированных клетках линии НЕК293 Phoenix; (а) и (в) – канал флуоресценции пиренильного эксимера ($\lambda_{ex} = 405$ нм, детекция флуоресценции в диапазоне длин волн 450-495 нм), (б) и (г) – объединенный канал (фазовый контраст и канал флуоресценции пиренильного эксимера).

Фоновая флуоресценция и автофлуоресценция фиксированных клеток отсутствовала. Для подтверждения специфического связывания зондов с РНК-мишенью фиксированные клетки обрабатывали РНКазой А, как описано в работе [89], с небольшими модификациями, промывали буфером и затем инкубировали с зондами. Как показано на рисунке 2.38, после обработки фиксированных клеток РНКазой А сигнал в канале эксимерной флуоресценции пирена отсутствует.

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

* * *

Подводя итоги, можно отметить, что нами разработаны универсальные подходы к синтезу пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), несущих остатки пирена в заданных положениях олигонуклеотидной цепи. С использованием этих подходов созданы три типа новых эксимер-образующих флуоресцентных зондов (линейные, тандемные и зонды типа «молекулярный маяк») на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции РНК. Исследованы физико-химические и биологические свойства этих зондов и их комплексов с РНК. Для всех типов зондов выбраны оптимальные варианты дизайна и продемонстрировано специфическое появление эксимерной

флуоресценции в дуплексе с РНК. В случае 2'-биспиренильных линейных зондов обнаружено, что нуклеотидное окружение, а именно наличие динуклеотидов CC, CG или UC с 3'-стороны от 2'-модифицированного нуклеотида оказывает положительное влияние на интенсивность эксимерной флуоресценции комплексов зондов с РНК-мишенью. Показано, что увеличение числа 2'-биспиренильных групп в зонде не приводит к увеличению соотношения сигнал/шум по сравнению с зондами, содержащими одну биспиренильную группу. Было продемонстрировано, что линейные 2'-биспиренильные зонды могут быть использованы для детекции протяженной структурированной РНК в растворе. Мы полагаем, что в перспективе такие зонды могут быть использованы и для визуализации РНК в клетках. В случае тандемных зондов с использованием физико-химических методов, а также методом МД, установлена оптимальная структура линкеров для возникновения эксимерной флуоресценции высокой интенсивности при связывании этих зондов с РНК. Для зондов типа «молекулярный маяк» структурной характеристикой для формирования эксимера при гибридизации зонда с РНК-мишенью стало вовлечение 5'-концевых нуклеотидов зонда в комплементарный комплекс с мишенью, обеспечивающее сближение 5'-биспиренильной группировки с двуспиральным участком комплекса. Созданные эксимер-образующие тандемные зонды и зонды типа «молекулярный маяк» были успешно использованы для визуализации 28S рРНК в фиксированных клетках.

Созданные зонды, а также выявленные закономерности возникновения эксимерной флуоресценции при гибридизации зондов с РНК могут быть использованы при разработке эффективных инструментов для детекции и визуализации других РНК-мишеней, а также могут стать основой для разработки новых высокочувствительных биосенсоров. Разработанные синтетические подходы могут быть адаптированы к синтезу других конъюгатов олигонуклеотидов с целью получения молекулярно-биологических инструментов и терапевтических агентов нового поколения.

Глава 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Исходные материалы

Реактивы и растворители

В работе были использованы 5',N-защищенные фосфитамиды: 5'-O-диметокситритил-N6-бензоил-2'-O-метиладенозин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, 5'-O-диметокситритил-N4-бензоил-2'-O-метил-цитидин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, 5'-O-диметокситритил-N2-диметиламинометилен-2'-O-метилгуанозин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, 5'-O-диметокситритил-2'-O-метилуридин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, 5'-O-диметокситритил-2'-O-третбутилдиметилсилилуридин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, 5'-O-диметокситритил-N4-ацетил-2'-O-третбутилдиметилсилилцитидин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, 5'-O-диметокситритил-N6-феноксиацетил-2'-O-третбутилдиметилсилиладенозин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, 5'-O-диметокситритил-N2-изопропилфеноксиацетил-2'-O-третбутилдиметилсилилгуанозин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида; фосфорилирующий реагент (Chemical phosphorylation reagent, CPR): 2[2-(4,4'-диметокситритилокси)-этилсульфонил]-этил-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида; аминомодифицирующие реагенты: 6-(трифторацетиламино)-гексил-(2-цианэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфитамида, 3-(трифторацетиламино)-пропил-(2-цианэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфитамида; полимерные носители с присоединенным первым нуклеозидным звеном: 5'-O-диметокситритил-N6-бензоил-2'-O-метиладенозин-3'-сукцинил-Icaa-CPG-500, 5'-O-диметокситритил-2'-O-метилуридин-3'-сукцинил-Icaa-CPG-500, 5'-O-диметокситритил-N4-ацетил-2'-O-третбутилдиметилсилиладенозин-3'-сукцинил-Icaa-CPG-500, 5'-O-диметокситритил-2'-O-третбутилдиметилсилилуридин-3'-сукцинил-Icaa-CPG-500, N-(3-(O-диметокситритил)-пропил)-(2-карбоксамид)-фталимидил-Icaa-CPG-500, N-(6-(O-диметокситритил)-гексил)-(2-карбоксамид)-фталимидил-Icaa-CPG-500, 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]-этил-2-сукцинил-Icaa-CPG-500 (Glen Research, США); (1R,4R)-4-гекс-5-иламиноциклогексил-(2-цианэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфитамида и N-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)пирен-1-карбоксамид (Lumiprobe, Германия); персульфат аммония, N,N'-метиленбисакриламид, краситель "Stains-all", трис(гидроксиметил)аминометан, дихлоруксусная кислота, акриламид, культуральные среды IMDM, DMEM (см. эксперименты на клетках), Silica gel (230-400 mesh, 60 Å) (Sigma, США), эмбриональная телячья сыворотка (ICN, США), молекулярные сита "Trap-Rac™ Molecular Sieve Bag" 3 Å (Millipore, США), 5-этилтио-1H-тетразол, 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен, N-метил-2-пирролидинон, 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан,

краситель SYBR[®] Green I (Aldrich, США), перхлорат лития, диэтилпирокарбонат, 2,6-лутидин, солянокислый цистеин, бис-триметилсилилацетамид, триэтиламинтригидрофторид, трифенилфосфин, 4-*N,N'*-диметиламинопиридин, 2,2'-дипиридилдисульфид, цетилтриметиламмоний бромид, янтарный ангидрид, бромид цинка, 2,4,6-триизопропилбензол сульфохлорид (Fluka, Швейцария), мочеви́на, 40%-ный водный раствор метиламина, нингидрин (Merck, Германия), ксиленцианол FF, бромфеноловый синий (Serva, Германия), *N*-метилимидазол (Acros, США), диметокситритилхлорид (Avocado Organics, США), 15% раствор уксусного ангидрида в тетрагидрофуране, тетрагидрофуран, пиридин (Panreac, Испания), ацетонитрил (Криохром, Россия), гидрохлорид 1-пиренилметиламина (Aldrich, Германия), тимидин (Reanal, Венгрия), этанол, натрий хлористый, триэтиламин, серный эфир, борная кислота, йод кристаллический, аммиак, серная кислота, формамид (Реахим, Россия), хлористый метилен (ОАО "Реактив", Россия), другие реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного и импортного производства. Безводные растворители получали в соответствии с [250]. Для ТСХ использовали пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Для синтеза полимерного носителя с присоединенным 3'-*O*-диметокситритилтимидином использовали аминомодифициро-ванный полистирольный носитель (120 мкмоль/г) (Amersham, США). Модифицированный полимерный носитель 4'-(2-нитро-4-толуолдиазо)-2'-метокси-5'-метил-азобензен-4'-(*N*-этил-2-*O*-(4,4'-диметокситритил))-*N*-этил-2-*O*-гликолат-CPG (ВНQ1-CPG) синтезирован Рябининым В.А. (Лаборатория биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН). Модифицированное макропористое стекло МПС-700-(CH₂)₃NHCO(CH₂)₂COOH синтезировано Ястребовым С.И.

Ферменты

В работе были использованы следующие ферменты: полинуклеотидкиназа фага T4 (КФ 2.7.1.78) (Thermo Fisher Scientific, США), эндонуклеаза рестрикции Sma I (КФ 3.1.4.30) (СибЭнзим, Россия), рибонуклеаза А (РНКаза А, КФ 3.1.27.5), Taq ДНК-полимераза (КФ 2.7.7.7), обратная транскриптаза AMV (КФ 2.7.7.49) (Thermo Fisher Scientific, США). Плазмида pMDR-670 была получена в соответствии с [220] и любезно предоставлена Мироновой Н.Л. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН). Для получения РНК-транскрипта использовали набор для транскрипции TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию и ПЦР вели с использованием набора нуклеозидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP и dTTP) (Thermo Fisher Scientific, США). Для очистки РНК-транскрипта от избытка нуклеозидтрифосфатов использовали колонки для очистки РНК-транскрипта Micro Spin[®] 30 (Bio-Rad, США).

3.2. Основные методы работы

Все водные растворы, были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью Simplicity System (Millipore, США). При необходимости растворы дополнительно стерилизовали автоклавированием.

Спектры ^1H -ЯМР (внутренний стандарт CDCl_3 (δ 7.24 м.д.)) зарегистрированы на спектрометре AV-300 (Bruker, Германия).

Концентрирование растворов олигонуклеотидов и их производных после отделения от полимерного носителя или обессоливания растворов осуществляли на вакуумном концентраторе Speed-Vac Concentrator SCV 100 H (Savant, США).

Введение радиоактивной метки на 5'-конец олигомеров проводили по [251], используя 0.07-0.1 мКи [γ - ^{32}P] АТФ (4000 Ки/моль, «Биосан», Россия) и полинуклеотидкиназу фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для подтверждения строения всех 2'-, 3'- и 5'-модифицированных олигонуклеотидов был использован метод MALDI-TOF масс-спектрометрии. Спектры были зарегистрированы на MALDI-TOF масс-спектрометрах REFLEX III (Bruker Daltonics, Германия) и AutoFlex (Bruker Daltonics, Германия) к.х.н. Ковалем В.В. и Касакиным М.Ф. (ОЦГПМИ ИХБФМ СО РАН). Предварительно проводили обессоливание олигонуклеотидов на картриджах ZipTip C18 (Millipore, США). Концентрация олигонуклеотидов в образцах для анализа составляла 20 мкмоль/л.

3.2.1. Определение ёмкости полимерных носителей с присоединенным первым нуклеозидным звеном

Ёмкость полученных в работе нуклеозидсвязанных полимерных носителей определяли по количеству диметокситритилкатионов, образующихся при кислотной обработке нуклеозидсвязанного полимера. При этом навеску нуклеозидсвязанного полимера (~2 мг) обрабатывали смесью $\text{HClO}_4:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (3:2). Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре UV-2100 (Shimadzu, Япония). Ёмкость полимера рассчитывали по формуле:

$$\text{Ёмкость (моль/г)} = (D \cdot V) / (l \cdot \epsilon \cdot m),$$

где D – оптическая плотность раствора на длине волны 499 нм (о.е.), V – объем раствора (мл), l – длина оптического пути (см), ϵ – коэффициент молярного поглощения диметокситритилкатиона в смеси $\text{HClO}_4:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (3:2, 59500 л/(см·моль)), m – масса навески нуклеозидсвязанного полимера (мг).

3.2.2. Тонкослойная и адсорбционная хроматография

Для ТСХ использовали пластинки DC-Alufohlen Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) и системы растворителей: этанол-дихлорметан, 0.3:9.7, (система А), этанол-дихлорметан, 0.5:9.5 (система Б). Результаты хроматографии визуализировали в УФ-свете прибора “Хроматоскоп М” (“ФИМЕТ”, Россия) и проявляли реактивом Дише (0.5%-ный раствор солянокислого цистеина в 3н H₂SO₄) при нагревании до 150 °С. Результаты хроматографии коммерческих препаратов фосфитаминов (система Б) дополнительно проявляли 0.1%-ным раствором нингидрина в спирте при нагревании до 150 °С.

Колоночную адсорбционную хроматографию проводили на силикагеле Silica gel (230-400 меш, 60 Å) (Sigma, США).

3.2.3. Аналитический электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях

Анализ гомогенности олигонуклеотидов и их производных проводили методом денатурирующего гель-электрофореза, разделение проводили в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид:N,N'-метиленбисакриламид (30:1), 8 М мочевины, 50 мМ Трис-H₃BO₃, pH 8.3, 0.1 мМ Na₂ЭДТА) при напряжении 50 В/см и толщине геля 0.4 мм. К олигонуклеотидным образцам (~0.05 о.е.) для нанесения на гель добавляли раствор 8 М мочевины (3-4 мкл), содержащий 0.025% ксиленцианолового FF и 0.025% бромфенолового синего. Для визуализации олигонуклеотидов и их производных использовали раствор, приготовленный из красителя “Stains-all” (50 мг) и смеси формамид:вода (1:1, 100 мл). После прокрашивания гели сушили в течение 1.5 - 2 ч на приборе Gel Dryer BioRad model 583 (Fisher BioRad, США).

3.2.4. Аналитический электрофорез в 1%-ном агарозном геле

Анализ гомогенности протяженных НК проводили методом гель-электрофореза в 1%-ной агарозе (агароза, 0.005% бромистый этидий, 50 мМ Трис-H₃BO₃, pH 8.3, 0.1 мМ Na₂ЭДТА) с использованием камеры MiniSub Cell GT (BioRad, США) при напряжении 10 В/см и толщине геля ~4-5 мм. К олигонуклеотидным образцам (0.5 мкг) для нанесения на гель добавляли раствор 50%-ного глицерина (5 мкл), содержащий 0.025% ксиленцианолового FF и 0.025% бромфенолового синего. После проведения электрофореза визуализацию НК в геле проводили в УФ-свете (365 нм) с использованием системы гель-документации “Gel imager 2” (Хеликон, Россия).

3.2.5. Аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ

Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ (офВЭЖХ) олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и их производных проводили на хроматографе «Альфахром» (Эконова, Россия) с использованием колонки ProntoSil-120-5-C18 AQ (75×2.0 мм, 5.0 мкм, Masherey-Nagel, Германия) в градиенте концентрации 0-25% (10 мин), 25-47.5% (1.3 мин), и 47.5-50% (2 мин) CH₃CN в буфере, содержащем 0.02 М триэтиламмоний ацетат, pH 5.5, скорость потока 150 мкл/мин. Количественные хроматографические данные в режиме детекции на двух длинах волн (260 и 345 нм) со спектрофотометрического детектора хроматографа «Альфахром» были получены и обработаны с помощью программы «Мультихром» (Эконова, Россия).

3.2.6. Выделение олигонуклеотидов методом препаративного гель-электрофореза

Выделение всех синтезированных в работе олигонуклеотидов и их конъюгатов проводили с помощью препаративного электрофореза в 15%-ном ПААГ в условиях, описанных выше для аналитического электрофореза, при этом толщину геля варьировали от 0.4-0.8 мм в зависимости от количества олигонуклеотидного материала. После электрофореза проводили УФ-визуализацию олигонуклеотидного материала в геле, наложенном на пластинку DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄. Полоски геля, содержащие целевой олигонуклеотид, вырезали и проводили элюцию.

3.2.7. Элюция олигонуклеотидов из ПААГ

Измельченный гель помещали в пробирку на 15 мл и заливали 0.3 М LiClO₄ (или NaClO₄) (5-6 мл) и выдерживали примерно 16 ч при 25 °С и перемешивании с использованием термомиксера (Thermomixer Compact, Eppendorf, Германия). Супернатант отбирали, добавляли к раствору 1/10 объема 3М LiClO₄ (или NaClO₄), обессоливали на Tet-Pak C18 Cartridge (Millipore, США), промывая сначала 0.05 М LiClO₄ (или NaClO₄), затем 50%-ным CH₃CN в 0.05 М LiClO₄ (или NaClO₄). Фракцию, содержащую продукт, упаривали досуха, остаток растворяли в 100 мкл воды и осаждали олигонуклеотидный материал в виде литиевых (или натриевых) солей.

3.2.8. Элюция 2'-биспиренильных производных олигонуклеотидов из ПААГ

Измельченный гель помещали в пробирку на 1.5 мл, заливали раствором для элюции (400 мкл, 0.3 М NaOAc (pH 5.2), 0.1% додецилсульфата натрия) и выдерживали 16 ч при 25 °С и перемешивании. Элюент отбирали и осаждали пиренильные конъюгаты этанолом в виде натриевых солей 2.5-кратным объемом перегнанного спирта в присутствии 0.3 М ацетата

натрия, pH 5.2. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали 75%-ным водным спиртом и сушили на воздухе.

3.2.9. Осаждение олигонуклеотидов и их пиренильных производных

1. Немодифицированные, фосфат-содержащие, аминок-модифицированные и монопиренильные олигонуклеотиды осаждали из водного раствора в виде литиевых (или натриевых) солей десятикратным объемом 2%-ного раствора LiClO₄ (или NaClO₄) в ацетоне. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе.

2. 2'-Биспиренильные производные олигонуклеотидов осаждали из водного раствора в виде литиевых (или натриевых) солей десятикратным объемом смеси 2%-ного раствора LiClO₄ (или NaClO₄) в ацетоне и серного эфира (1:1). Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе.

3.2.10. Получение олигонуклеотидов в форме цетилтриметиламмониевой соли

Для получения олигонуклеотидов в форме цетилтриметиламмониевой соли, растворимых в органических растворителях, к соответствующему олигонуклеотиду (1-10 OE₂₆₀), растворенному в воде (10-20 мкл), добавляли 8%-ный раствор бромид цетилтриметиламмония по 2 мкл до прекращения выпадения осадка. Супернатант после центрифугирования удаляли, осадок сушили в течение 1 ч над P₂O₅ при давлении 1-2 мм.рт.ст.

3.2.11. Регистрация спектров оптического поглощения и расчет коэффициентов молярного поглощения

Спектры оптического поглощения олигонуклеотидов и их пиренильных конъюгатов в УФ и видимой области регистрировали на спектрофотометрах UV-1800 UV-Vis (Shimadzu, Япония) и BioSpectrometer (Eppendorf, Германия) в кварцевой кювете (длина оптического пути 10 мм) при температуре 25 °С в 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (pH 7.4), 1 мМ Na₂ЭДТА.

Оптическую плотность рабочих растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Молярные коэффициенты поглощения немодифицированных олигонуклеотидов при 260 нм рассчитывали по данным работы [252].

Коэффициенты молярного поглощения олигонуклеотидов при 260 нм рассчитывали с учетом гипохромного эффекта по формуле [252]:

$$\varepsilon = 2 \cdot (\varepsilon_{1,2} + \varepsilon_{2,3} + \dots + \varepsilon_{n-1,n}) - \varepsilon_2 - \varepsilon_3 - \dots - \varepsilon_{n-1},$$

где ε_i – коэффициент молярного поглощения нуклеотида N,

$\varepsilon_{i-1,i}$ – коэффициент молярного поглощения для пары нуклеотидов.

Значения молярных коэффициентов поглощения для 2'-*O*-метилрибонуклеотидов принимали равными соответствующим молярным коэффициентам поглощения для рибонуклеотидов. Молярные коэффициенты поглощения олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих тимидин, присоединенный через 3'-3'-межнуклеотидную связь, считали равным сумме значений молярных коэффициентов поглощения соответствующих олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и значения молярного коэффициента поглощения тимидина. Молярные коэффициенты поглощения пиренильных производных олигонуклеотидов считали равными сумме значений молярных коэффициентов поглощения олигонуклеотидов и молярного коэффициента поглощения соответствующего количества остатков пирена, присоединенных к олигомеру ($24000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ при 260 нм) [230]. Молярные коэффициенты поглощения производных олигонуклеотидов, содержащих тушитель ВНQ1, считали равными сумме значений молярных коэффициентов поглощения олигонуклеотидов и молярного коэффициента поглощения этого тушителя, присоединенного к олигомеру ($8\ 000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ при 260 нм).

Для подтверждения количества остатков пирена в составе конъюгатов записывали их спектры поглощения и сравнивали отношение поглощения на длинах волн 260 нм и 345 нм с теоретическим соотношением интенсивностей.

3.2.12. Регистрация спектров флуоресценции пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и их дуплексов с НК

Спектры испускания флуоресценции пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) регистрировали на спектрофлуориметре Carry Eclipse (Varian Inc., США) в кварцевых кюветах (длина оптического пути 4 мм и 10 мм) при температуре 25 °С в 0.1 М NaCl, 10 mM какодилат натрия (pH 7.4), 1 mM Na₂ЭДТА при возбуждении светом с длиной волны 345 нм в диапазоне 360-600 нм. Концентрации олигонуклеотидных компонентов были $1 \cdot 10^{-7}$ М в случае 2'-биспиренильных линейных и 3'- и 5'-монопиренильных тандемных зондов и соответствующих дуплексов с РНК-мишенями, и $1 \cdot 10^{-6}$ М в случае 5'-биспиренильных зондов типа «молекулярный маяк» и соответствующих дуплексов с РНК-мишенью. Термостатирование проводили с использованием Thermostatic circulator 2219 Multitemp II (LKB Bromma, Швеция).

3.3. Методики эксперимента

3.3.1. Синтез 5',3'-*O*-бис-(4,4'-диметокситритил)тимидина (2.1)

Получение 5',3'-*O*-бис-(4,4'-диметокситритил)тимидина проводили по аналогии с [224], используя в качестве исходного нуклеозида тимидин (Схема 2.1). Навеску тимидина (2 ммоль, 0.5 г) сушили упариванием с абсолютным пиридином (3 раза по 30 мл), растворяли в 30 мл

абсолютного пиридина и добавляли предварительно высушенный диметокситритилхлорид (4 ммоль, 1.4 г). Реакционную смесь оставляли на 48 ч при 50 °С и перемешивании. За ходом реакции следили с использованием ТСХ (система А). Избыток диметокситритилхлорида разлагали CH_3OH (10 мл). После окончания реакции смесь упаривали досуха, растворяли в CH_2Cl_2 (30 мл) и экстрагировали водным раствором 1М NaHCO_3 (60 мл). Водную фазу промывали CH_2Cl_2 (20 мл×5). Объединенные органические слои сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали. Для удаления следов пиридина реакционную смесь дополнительно упаривали с толуолом (30 мл×3) и этанолом (30 мл×2). Проводили хроматографию на силикагеле (размер колонки 5×12 см), для элюции использовали ступенчатый градиент концентрации CH_3OH (0-4%) в CH_2Cl_2 , содержащем 0.01% ТЕА (шаг концентрации CH_3OH в CH_2Cl_2 составил 1%, общий объем элюента примерно 0.8 л). Фракции, содержащие бис-диметокситритилированный продукт, дающий оранжевую окраску с реактивом Дише и обладающий бóльшим R_f , объединяли и упаривали досуха.

Выход 90%. $R_f = 0.25$ (система А). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 7.86 (1H, с, 6-H); 7.50-6.65 (13H, м, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$ -); 6.40 (1H, д, 1'-H); 4.50-3.15 (6H, м, 2',3',4',5'-H); 3.76 (6H, с, $-\text{OCH}_3$ в $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$ -).

3.3.2. Синтез 3'-O-(4,4'-диметокситритил)тимидина (2.2)

Получение 3'-O-(4,4'-диметокситритил)тимидина проводили по аналогии с [224] с небольшими изменениями (Схема 2.1). Предварительно высушенную навеску 3',5'-O-бис-диметокситритилтимидина (1.8 ммоль, 1.5 г) растворяли в абсолютном диоксане (40 мл) и охлаждали полученный раствор до 0 °С, а затем добавляли сухой ZnBr_2 (9 ммоль, 2 г). Реакцию проводили в течение 48 ч при 50 °С и постоянном перемешивании. За ходом реакции следили с использованием ТСХ (система А). После окончания реакции (по результатам ТСХ) к реакционной смеси приливали 1 М ТЕАас, рН 7.0 (40 мл) для прекращения реакции. Органический слой отделяли, промывали водой (2 раза по 20 мл), насыщенным водным раствором NaCl (20 мл×2), сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали до состояния масла. Проводили хроматографию на силикагеле (размер колонки 5×12 см), для элюции использовали сначала ступенчатый градиент концентрации CH_2Cl_2 (0-100%) в гексане (шаг концентрации CH_2Cl_2 в гексане составил 25%, общий объем элюента примерно 1 л), а затем ступенчатый градиент концентрации CH_3OH (0-4%) в CH_2Cl_2 , содержащем 0.01% ТЕА (шаг концентрации CH_3OH в CH_2Cl_2 составил 1%, общий объем элюента примерно 0.8 л). Фракции, содержащие 3'-O-диметокситритилированный продукт (по данным ТСХ), объединяли и упаривали до образования сухой пенки.

Выход 55%. $R_f = 0.18$ (система А). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ , м.д.: 8.07 (1H, с, 6-H); 7.50-6.70 (13H, м, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr-}$); 6.10 (1H, д, 1'-H); 4.40-3.20 (6H, м, 2',3',4',5'-H); 3.78 (6H, с, $-\text{OCH}_3$ в $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr-}$).

3.3.3. Синтез карбоксимодифицированного полистирола (2.3)

Предварительно высушенную навеску аминомодифицированного полистирольного носителя (0.5 г, 120 мкмоль/г) обрабатывали янтарным ангидридом (2.5 ммоль, 0.25 г) в присутствии *N*-метилимидазола (2.5 ммоль, 215 мкл) в течение 16 ч при комнатной температуре. Полимерный носитель промывали пиридином (2 раза по 500 мкл), 50% пиридином в воде (2 раза по 500 мкл), пиридином (2 раза по 500 мкл), метанолом (2 раза по 300 мкл), серным эфиром (3 раза по 500 мкл), сушили на воздухе.

3.3.4. Присоединение **3'-*O*-(4,4'-диметокситритил)тимидина** к карбоксимодифицированному полистиролу и МПС **к**

Синтез проводили по аналогии с [225] (Схема 2.1). К смеси предварительно высушенных навесок карбоксимодифицированного полистирола (100 мг) или МПС-700- $(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, 3'-*O*-диметокситритилтимидина (0.024 ммоль, 13 мг) и 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид (TPS) (0.052 ммоль, 16 мг) добавляли ацетонитрил (1 мл) и *N*-метилимидазол (0.30 ммоль, 26 мкл) и перемешивали. Реакцию вели 2 ч при 37 °С и перемешивании. По окончании реакции к реакционной смеси добавляли 600 мкл абс. CH_3OH и оставляли реакционную смесь на 30 мин при 25 °С. Промывали полимер последовательно абсолютным ацетонитрилом (5 раз по 500 мкл), этанолом (5 раз по 500 мкл), ацетоном (5 раз по 500 мкл), серным эфиром (3 раза по 500 мкл) и высушивали на воздухе, а затем над P_2O_5 при 1-2 мм. рт. ст. Емкость полученных тимидинсодержащих полимерных носителей (2.4) и (2.5) составила 118 мкмоль/г и 53 мкмоль/г, соответственно.

3.3.5. Автоматический фосфитамидный синтез олигонуклеотидов

Синтез всех использованных в работе полимерсвязанных защищенных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и их производных проводили на синтезаторах ASM-102U и ASM-800 («Биоссет», Новосибирск, Россия). Синтез вели согласно оптимизированному протоколу операций, приведенному в таблице 3.1, в масштабе 0.4 мкмоль (на синтезаторе ASM-800, полимерный носитель МПС или CPG, реактор на 50 мкл) и в масштабе 0.25 мкмоль (на синтезаторе ASM-102U, полистирольный носитель, реактор на 25 мкл). С использованием соответствующих полимерных носителей в результате операций 1-12 (Табл. 3.1) получали полимерсвязанные защищенные олигомеры, не содержащие диметокситритильную группу.

Таблица 3.1. Последовательность операций автоматического фосфитамидного синтеза олигонуклеотидов

№ п/п	Операция	Реагент	Объем, мкл		Время, сек	
			Стекло ¹	Поли- стирол ²	Стекло ¹	Поли- стирол ²
1.	Промывка	CH ₃ CN	280	180	19	23
2.	Промывка	CH ₂ Cl ₂	190	260	17	32
3.	Детритилирование	3% CHCl ₂ COOH в CH ₂ Cl ₂	290	170	92	92
4.	Промывка	CH ₃ CN	290	460	20	37
5.	Промывка	CH ₃ CN абс.	250	440	10	20
6.	Конденсация	1) 0.05 М раствор мономера; 2) 0.3 М раствор фосфорилирующего реагента; 3) 0.1 М раствор фосфорилирующего реагента; 4) 0.2 М раствор С3-амино- или С6-аминомодифицирующего реагента; 0.25 М 5-(этилтио)-1H-тетразол в CH ₃ CN абс.	1) 54 ³ , 64 ⁴ , 74 ⁵ 3) 74 4) 124	1) 80 2) 80	1) 370 ³ , 460 ⁴ , 550 ⁵ 3) 1920 4) 1800	1) 370 ³ , 460 ⁴ , 550 ⁵ 2) 1710
7.	Промывка	CH ₃ CN	60	75	3	5
8.	Кэпирование	16% N-метилимидазол в THF; 10% As ₂ O, 10% 2,6-лутидин в THF	130 100	210 160	55	70
9.	Промывка	CH ₃ CN абс.	30	60	35	70
10.	Окисление	0.02 М J ₂ в THF: Py : H ₂ O (90: 1: 9)	160	200	38	38
11.	Повтор п. 1-10					
12.	Конец синтеза Повтор п. 1-4					

¹ Полимерные носители на основе SiO₂ (нуклеозид-связанный CPG или МПС с присоединенным 3'-O-(4,4'-диметокситритил)тимидином (2.5)); ² полистирол с присоединенным 3'-O-(4,4'-диметокситритил)тимидином (2.4); ³ для 5'-O-диметокситритил-2'-O-метилнуклеозид-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамидов (A, C, U); ⁴ для 5'-O-диметокситритил-N2-диметиламинометилен-2'-O-метилгуанозин-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида; ⁵ для 5'-O-диметокситритил-2'-O-третбутилдиметилсилилнуклеозид-3'-N,N-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамидов (U, C, A, G).

После окончания твердофазного синтеза полученные защищенные полимерсвязанные олигонуклеотиды сушили для удаления следов ацетонитрила в течение 2 мин с помощью мембранного насоса (DOA V130 BN, Waters, США). Затем проводили удаление *N*-защитных групп с азотистых оснований олигонуклеотида и его отделение от полимерного носителя 40%-ным водным раствором CH_3NH_2 (300 мкл), и выдерживали 15 мин при 65 °С и перемешивании. Затем охлажденные до комнатной температуры растворы отделяли от полимера, полимер промывали смесью CH_3CN , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и H_2O (1:1:1 v/v/v, 3 раза по 100 мкл). Объединенные растворы упаривали до сухого остатка. В случае олигорибонуклеотидов ***RNA1***, ***RNA2*** и ***RNA4*** проводили удаление 2'-*O*-третбутилдиметилсилильных-защитных групп обработкой свежеприготовленной смеси *N*-метил-2-пирролидинона, триэтиламина и TEA·3HF (6:4:3 v/v/v, 500 мкл) в течение 2 ч при 65 °С [228]. Полученные олигонуклеотиды анализировали электрофорезом в 15% денатурирующем полиакриламидном геле. Выделяли целевые олигомеры препаративным гель-электрофорезом в денатурирующих условиях.

3.3.6. Получение 2'-фосфатсодержащих олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих «инвертированный» тимидин на 3'-конце (*1L1p-1L18p*, *2L1p-2L8p*)

Для ацетилирования 5'-ОН группы полистиролсвязанных защищенных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих вставки 2'-*O*-TBDMS-звеньев, после финального цикла синтеза олигонуклеотида повторяли операции 7-9 (Табл. 3.1). Затем полистиролсвязанные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) после ацетилирования 5'-гидроксила вводили в реакцию 2'-фосфорилирования (Схема 2.2). Для этого через реактор сначала пропускали смесь *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамида (BSA) и THF (1:1 v/v, 500 мкл) при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем смесь, содержащую 5% 1,8-дiazобидикло[5,4,0]ундецена-7 (DBU) в смеси BSA и THF (1:1 v/v, 500 мкл) в течение 30 мин (Схема 2.2, стадии 5,6). Затем промывали содержимое реактора последовательно абс. THF, абс. CH_3CN , абс. DMFA, ацетоном (по 250 мкл) и сушили на воздухе. Проводили удаление 2'-*O*-третбутилдиметилсилильных защитных групп полимерсвязанных олигонуклеотидов (в реакторе) обработкой свежеприготовленной смеси *N*-метил-2-пирролидинона, триэтиламина и TEA·3HF (6:4:3 v/v/v, 500 мкл) в течение 2 ч при 65 °С (Схема 2.2, стадия 7). Промывали полимерсвязанный олигонуклеотид последовательно абс. CH_3CN , абс. DMFA, абс. CH_3CN , ацетоном (по 250 мкл) и сушили на воздухе. Затем проводили стадию 2'-фосфорилирования как стандартный цикл фосфитамидного синтеза с использованием 0.3 М раствора 2[2-(4,4'-диметокситритилокси)-этилсульфонил]-этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (**2.12**) (фосфорилирующий реагент) в абс. CH_3CN и 5-(этилтио)-1*H*-тетразола в абс. CH_3CN в качестве конденсирующего реагента (0.25 М, время конденсации 30 мин) (Схема 2.2, стадии 8,4,1). Полимер с присоединенным защищенным

олигонуклеотидом переносили в пробирку на 0.6 мл, добавляли 40%-ный водный раствор CH_3NH_2 (300 мкл), и выдерживали 15 мин при 65 °С и перемешивании (Схема 2.2, стадии 9). Затем растворы выдерживали при -20 °С в течение 15-20 мин, отделяли раствор от полимера, полимер промывали смесью CH_3CN , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и H_2O (1:1:1 v/v/v, 100 мкл×3). Объединенные растворы упаривали до сухого остатка. Сухой олигонуклеотидный остаток растворяли в 100 мкл воды и измеряли оптическую плотность растворов. Полученный олигонуклеотидный материал анализировали электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле, а затем целевой олигонуклеотид выделяли препаративным гель-электрофорезом в денатурирующих условиях. Последовательности и характеристики синтезированных 2'-фосфатсодержащих олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *1L1p-1L18p*, *2L1p-2L8p* представлены в таблице 2.2.

3.3.7. Синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида), содержащего фосфат на 3'-конце (*1Tp*)

Реактор, заполненный модифицированным полимерным носителем 2-[2-(4,4'-диметоксиэтилокси)этилсульфонил]этил-2-сукционил)-Iсаа-CPG (**2.6**) (емкость 48 мкмоль/г) помещали в лунку синтезатора и проводили синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) стандартным твердофазным фосфитамидным методом согласно последовательности операций, описанных в таблице 3.1. Деблокирование, выделение и анализ гомогенности полученного производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) проводили в стандартных условиях. Последовательность и характеристики синтезированного 3'-фосфатсодержащего олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) представлена в таблице 2.9.

3.3.8. Синтез 5'-фосфатсодержащего олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (*2Tp*)

Стадию 5'-фосфорилирования полимерсвязанного олигонуклеотида *2Tp* проводили как заключительный стандартный цикл фосфитамидного синтеза с использованием 0.1 М раствора 2[2-(4,4'-диметокситритилокси)-этилсульфонил]-этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (**2.12**) в абс. CH_3CN и 5-(этилтио)-1*H*-тетразола в абс. CH_3CN в качестве конденсирующего реагента (0.25 М, время конденсации 10 мин). Деблокирование, выделение и анализ гомогенности полученного производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) проводили в стандартных условиях. Последовательность и характеристики синтезированного 5'-фосфатсодержащего олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) *2Tp* представлены в таблице 2.9.

3.3.9. Синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих амиолинкер на 3'-конце (*1T5a* и *1T6a*)

Для получения олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) *1T5a* и *1T6a*, содержащих амиопропильный или амиогексильный линкер на 3'-конце, реакторы заполняли

модифицированными полимерными носителями *N*-(3-(*O*-диметокситритил)-пропил)-(2-карбоксамид)-фталимидил-*I*саа-CPG (**2.7**) (емкость 28 мкмоль/г) или *N*-(3-(*O*-диметокситритил)-(гексил))-(2-карбоксамид)-фталимидил-*I*саа-CPG (**2.8**) (емкость 25 мкмоль/г), помещали реакторы в синтезатор и проводили синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) стандартным твердофазным фосфитамидным методом согласно последовательности операций, описанных в таблице 3.1. Деблокирование, выделение и анализ гомогенности полученного производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) проводили в стандартных условиях. Последовательности и характеристики синтезированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих аминолинкер на 3'-конце **1T5a** и **1T6a** представлены в таблице 2.9.

3.3.10. Синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих аминолинкер на 5'-конце (2T5a и 2T6a)

Для получения олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **2T5a** и **2T6a**, содержащих аминопропильный или аминогексильный линкер на 5'-конце, в конце автоматического фосфитамидного синтеза проводили дополнительную стадию конденсации как стандартный цикл фосфитамидного синтеза с использованием 0.2 М раствора 6-(трифторацетиламино)-гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидита (**2.9**) (C6-амино-модифицирующего реагента) или 3-(трифторацетиламино)-пропил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидита (**2.10**) (C3-амино-модифицирующего реагента), соответственно, в абс. CH₃CN и 5-(этилтио)-1*H*-тетразола в абс. CH₃CN в качестве конденсирующего реагента (0.25 М, время конденсации 10 мин). Деблокирование, выделение и анализ гомогенности полученных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) проводили в стандартных условиях. Последовательности и характеристики синтезированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**2T5a** и **2T6a**) содержащих аминолинкер на 5'-конце представлены в таблице 2.9.

3.3.11. Синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих алкиновый линкер на 5'-конце (2T7a)

Для получения олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) **2T7a**, содержащего алкиновый линкер на 5'-конце, в конце автоматического фосфитамидного синтеза проводили дополнительную стадию конденсации как стандартный цикл фосфитамидного синтеза с использованием 0.1 М раствора (1*R*,4*R*)-4-гекс-5-иламиноциклогексил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (5'-алкин-модифицирующего реагента) в абс. CH₃CN и 5-(этилтио)-1*H*-тетразола в абс. CH₃CN в качестве конденсирующего реагента (0.25 М, время конденсации 10 мин). Деблокирование, выделение и анализ гомогенности полученного производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) проводили в стандартных условиях. Последовательность и характеристики синтезированного

олиго(2'-*O*-метил-рибонуклеотида) **2T7a**, содержащего а на 5'-конце представлены в таблице 2.9.

3.3.12. Синтез 5'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**MB1p-MB4p**, **H1p-H4p** и **LP1p-LP4p**)

Для получения модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **MB1p-MB4p**, содержащих тушитель ВНQ1 на 3'-конце, использовали модифицированный полимерный носитель 4'-(2-нитро-4-толуолдиазо)-2'-метокси-5'-метил-азобензен-4'-(*N*-этил-2'-*O*-(4,4'-диметокситритил))-*N*-этил-2'-*O*-гликолат-CPG (емкость 41 мкмоль/г). Синтез олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **H1p-H4p** и **LP1p-LP4p** вели с использованием полимерных носителей на основе CPG с присоединенным первым нуклеозидным звеном. После синтеза олигонуклеотидной цепи проводили стадию 5'-фосфорилирования как заключительный стандартный цикл фосфитамидного синтеза с использованием раствора 0.1 М 2[2-(4,4'-диметокситритилокси)-этилсульфонил]-этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида в абс. CH₃CN и 5-(этилтио)-1*H*-тетразола в абс. CH₃CN в качестве конденсирующего реагента (0.25 М, время конденсации 10 мин) (Схема 2.7).

Деблокирование синтезированных модифицированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **MB1p-MB4p** в мягких условиях. Полимер с присоединенным защищенным олигонуклеотидом переносили в пробирку на 0.6 мл, приливали раствор K₂CO₃ в метаноле (0.05 М, 400 мкл) и проводили деблокирование олигонуклеотида в течение 16 ч при комнатной температуре и перемешивании. Затем отделяли раствор от полимера, полимерный носитель промывали смесью CH₃CN, C₂H₅OH и H₂O (1:1:1 v/v/v, 100 мкл×3). Объединенный раствор нейтрализовали добавлением 3 мкл ледяной уксусной кислоты. Раствор, содержащий осадок, упаривали до 100 мкл. Высаживали олигонуклеотидный материал из раствора в виде натриевых солей.

Деблокирование 5'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **H1p-H4p** и **LP1p-LP4p** проводили в стандартных условиях.

Полученную смесь модифицированных олигонуклеотидов анализировали методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле, а затем выделяли целевой модифицированный олигонуклеотид препаративным гель-электрофорезом в денатурирующих условиях.

3.3.13. Синтез 2'-биспиренильных производных олигонуклеотидов (**1L1-1L8** и **2L1-2L8**)

Получение 2'-биспиренильных производных олигонуклеотидов **1L1-1L8** и **2L1-2L8** проводили по аналогии с [18], с небольшими изменениями (Схема 2.5). К 10 OE₂₆₀ (0.12

мкмоль) олигонуклеотидного материала после синтеза или 3 ОЕ₂₆₀ (0.05 мкмоль) выделенного 2'-фосфатсодержащего олигонуклеотида **1L1p-1L8p** и **2L1p-2L8p** в виде цетилтриметиламмониевой соли прибавляли 4-*N,N'*-диметиламинопиридин (20 мкмоль, 5 мг) в абс. DMSO (50 мкл), трифенилфосфина (25 мкмоль, 7 мг) в абс. DMSO (25 мкл), 2,2'-дипиридилдисульфид (25 мкмоль, 6 мг) в абс. DMSO (25 мкл) и инкубировали 15 мин при 56 °С и перемешивании. После этого добавляли гидрохлорид 1-пиренилметиламина (15 мкмоль, 4 мг) в абс. DMSO (10 мкл) и абс. ТЕА (5 мкл), реакционную смесь инкубировали 2 ч при 56 °С и перемешивании. Осаждение и выделение конъюгатов осуществляли как описано выше (разделы 3.2.6-3.2.9). Последовательности и характеристики синтезированных 2'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **1L1-1L8**, **2L1-2L8** представлены в таблице 2.3.

3.3.14. Синтез 5'-биспиренильных производных олигонуклеотидов (MB1-MB4**, **H1-H4** и **LP1-LP4**)**

Получение 5'-биспиренильных производных олигонуклеотидов **MB1-MB4**, **H1-H4** и **LP1-LP4** проводили по аналогии с [18] (Схема 2.8). К 3 ОЕ₂₆₀ (~0.05 мкмоль) олигонуклеотидного материала после синтеза 5'-фосфатсодержащего олигонуклеотида **MB1p-MB4p**, **H1p-H4p** и **LP1p-LP4p** в виде цетилтриметиламмониевой соли прибавляли 4-*N,N'*-диметиламинопиридин (20 мкмоль, 5 мг) в DMSO абс. (50 мкл), трифенилфосфин (25 мкмоль, 7 мг) в DMSO абс. (25 мкл), 2,2'-дипиридилдисульфид (25 мкмоль, 6 мг) в DMSO абс. (25 мкл) и оставляли на 15 мин при 56 °С и перемешивании. Далее добавляли гидрохлорид 1-пиренилметиламина (7.5 мкмоль, 2 мг) в DMSO абс. (10 мкл) и ТЕА абс. (5 мкл), реакционную смесь оставляли на 2 ч при 56 °С и перемешивании. Осаждение и выделение конъюгатов осуществляли как описано выше (разделы 3.2.6, 3.2.7 и 3.2.9). Последовательности и характеристики синтезированных 5'-биспиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) **MB1-MB4**, **H1-H4** и **LP1-LP4** представлены в таблице 2.15.

3.3.15. Синтез 3'- и 5'-монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (1T1** и **2T1**)**

Получение 3'- и 5'-монопиренильных производных олигонуклеотидов проводили по аналогии с [131] (Схема 2.6). К 3 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидного материала после синтеза олигонуклеотида **1Tp** или **2Tp** в виде цетилтриметиламмониевой соли добавляли 4-*N,N'*-диметиламинопиридин (41 мкмоль, 5 мг) в абс. DMSO (50 мкл), трифенилфосфин (25 мкмоль, 6.8 мг) в абс. DMSO (25 мкл), 2,2'-дипиридилдисульфид (25 мкмоль, 5.3 мг) в абс. DMSO (25 мкл) и перемешивали 15 мин при 37 °С. Олигонуклеотид с активированным фосфатом

осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне, промывали осадок ацетоном, растворяли в H_2O (5 мкл), прибавляли гидрохлорид 1-пиренилметиламина (7.5 мкмоль, 2 мг) в смеси абс. DMSO (25 мкл) и абс. ТЕА (5 мкл), инкубировали реакцию смесь 2 ч при 37 °С и перемешивали. Нуклеотидный материал осаждали в виде литиевых солей и сушили на воздухе при 37 °С. Полученные 3'- и 5'-монопиренильные производные **1T1** и **2T1** выделяли методом препаративного гель-электрофореза, обессоливали и осаждали в виде литиевых солей. Характеристики синтезированных конъюгатов приведены в таблице 2.10.

3.3.16. Синтез 3'- и 5'-монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (1T2 и 2T2-2T4)

К 3 OE_{260} олигонуклеотидного материала после синтеза олигонуклеотида **1Tp** или **2Tp** в виде цетилтриметиламмониевой соли добавляли 4-N,N-диметиламинопиридин (41 мкмоль, 5 мг) в абс. DMSO (50 мкл), трифенилфосфин (25 мкмоль, 6.8 мг) в абс. DMSO (25 мкл) и 2,2'-дипиридилдисульфид (25 мкмоль, 5.3 мг) в абс. DMSO (25 мкл) и перемешивали 15 мин при 37 °С. К олигонуклеотиду с активированным фосфатом добавляли рассчитанное количество диамина, а именно: в случае конъюгатов **1T2a** или **2T2a** этилендиамин (29 мкмоль, 2 мкл), для получения **2T3a** 1,4-диаминобутан (2.9 мкл, 29 мкмоль) или 1,6-диаминогексана (29 мкмоль, 3.4 мг) в случае **2T4a**, и перемешивали реакцию смесь 1 ч при 37 °С. Нуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне, промывали осадки ацетоном и сушили на воздухе при 37 °С. Сухой осадок растворяли в H_2O (5 мкл), добавляли N-оксисукцинимидный эфир 1-пиренбутановой кислоты (5.2 мкмоль, 2 мг) в абс. DMFA (20 мкл) порциями по 10, 5 и 5 мкл каждые 30 мин при перемешивании при 37 °С (Схема 2.6). Нуклеотидный материал осаждали в виде литиевых солей и сушили на воздухе при 37 °С. Полученные 3'- и 5'-монопиренильные производные **1T2** и **2T2-2T4** выделяли методом препаративного гель-электрофореза, обессоливали и осаждали в виде литиевых солей. Характеристики синтезированных конъюгатов приведены в таблице 2.10.

3.3.17. Синтез 3'-монопиренильных производных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (1T5, 1T6, 2T5 и 2T6)

К 10 OE_{260} олигонуклеотидного материала после синтеза олигонуклеотидов **1T5a**, **1T6a**, **2T5a** и **2T6a** растворяли в 0.1 М NaHCO_3 , рН 8.3-8.5 (10 мкл), добавляли раствор N-оксисукцинимидного эфира 1-пиренбутановой кислоты (5 мкмоль, 2 мг) в абс. DMFA (20 мкл) порциями по 10, 5 и 5 мкл каждые 30 мин (Схема 2.6). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании 2 ч при 25 °С. Нуклеотидный материал осаждали в виде литиевых солей, промывали осадки ацетоном и сушили на воздухе при 37 °С.

Полученные 3'- и 5'-монопиренильные производные *1T5*, *1T6*, *2T5* и *2T6* выделяли методом препаративного гель-электрофореза, обессоливали и осаждали в виде литиевых солей. Характеристики синтезированных конъюгатов приведены таблице 2.10.

3.3.18. Синтез 5'-монопиренильного производного олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (*2T7*)

Синтез проводили в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, для синтеза меченых олигонуклеотидов методом "клик"-химии (Lumiprobe, США) (Схема 2.6). 15 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидного материала после синтеза олигонуклеотида *2T7* растворяли в H₂O тж (130 мкл), добавляли последовательно 268 мкл раствора, содержащего триэтиламмоний ацетат (рН 7.0, 0.53 ммоль) и комплекс Cu(II)-ТВТА в смеси вода:DMSO (2.7 мкмоль, 45:55 v/v), раствор N-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил)пирен-1-карбоксамид в DMSO (10 mM, 4 мкл), хорошо перемешивали и проводили дегазирование смеси аргоном в течение 30 сек. Добавляли раствор аскорбиновой кислоты (25 mM, 8 мкл) и повторно дегазировали реакционную смесь. Реакцию вели в течение 16 ч при комнатной температуре и перемешивании. По окончании реакции добавляли водный раствор LiClO₄ (2 M, 70 мкл) до концентрации 0.3 M и осаждали нуклеотидный материал в виде литиевой соли.

Полученный 5'-монопиренильный конъюгат *2T7* выделяли методом препаративного гель-электрофореза, обессоливали и осаждали в виде литиевой соли. Характеристики синтезированного конъюгата приведены таблице 2.10.

3.3.19. Исследование устойчивости олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и их 2'-биспиренильных производных к нуклеотической деградации ферментами сыворотки

Исследование устойчивости олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и их пиренильных производных в культуральной среде проводили, используя 5'-[³²P]-фосфат-меченные олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды инкубировали при 37 °С в культуральной среде, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Аликвоты отбирали через 5, 10, 30, 60, 120, 180, 360 мин, 1 сутки, добавляли раствор для нанесения (8M мочевины, 0.025% ксиленицианолового, 0.025% бромфенолового синего) и анализировали методом гель-электрофореза с последующей радиоавтографией на фосфоримиджере Pharos FX Plus (BioRad, США). Радиоавтограф геля переводили в цифровую форму с использованием программного пакета Quantity One (BioRad, США).

3.3.20. Исследование термической стабильности дуплексов пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с НК-мишенями

Исследование термической стабильности дуплексов пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с НК-мишенями с детекцией по оптической плотности проводили в

буфере 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 1 мМ Na₂ЭДТА при концентрации каждого из компонентов дуплекса, равной $1 \cdot 10^{-6}$ М. Растворы, содержащие компоненты дуплексов, сначала нагревали до 92 °С, а затем медленно охлаждали до начальной температуры эксперимента. Дифференциальные кривые термической денатурации дуплексов были получены к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН) на установке с терморегулируемой оптической кюветой Temperature Probes Accessory Series II на базе спектрофотометра Cary 300 BioMelt (Varian Inc., Australia). Температуру изменяли со скоростью 0.5 °С/мин. Детекцию поглощения осуществляли на трех длинах волн (260, 270 и 300 нм). Обработку кривых термической денатурации проводили с использованием программного пакета Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). Температуры плавления были рассчитаны к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым с использованием термодинамических параметров дуплексов ΔH и ΔS , которые были получены как описано в работах [231,232].

3.3.21. Исследование влияния температуры на изменения спектров поглощения дуплексов пиренильных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) с НК-мишенями

Исследование влияния температуры на изменения спектров поглощения дуплексов пиренильных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) с НК-мишенями с детекцией по оптической плотности проводили в буфере 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 1 мМ Na₂ЭДТА при концентрации каждого из компонентов дуплекса равной $5 \cdot 10^{-6}$ М. Растворы, содержащие компоненты дуплексов сначала нагревали до 92 °С, а затем медленно охлаждали до начальной температуры эксперимента. Спектры поглощения дуплексов в диапазоне 220-400 нм были получены к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН) на спектрофотометре Cary 300 BioMelt, оснащенном терморегулируемой оптической кюветой Temperature Probes Accessory Series II (Varian Inc., Australia). Температуру изменяли со скоростью 0.5 °С/мин. Обработку кривых термической денатурации проводили с использованием программного пакета Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

3.3.22. Синтез *in vitro* транскрипта фрагмента мРНК гена MDR1 (RNA3)

Синтез *in vitro* транскрипта фрагмента *PGY1/MDR1* мРНК проводили по аналогии с [220,253]. В качестве ДНК-матрицы использовали линейаризованную плазмиду рMDR-670.

Для получения матрицы для *in vitro* транскрипции плазмиду рMDR-670 линейаризовали эндонуклеазой рестрикции SmaI. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 мкг ДНК рMDR-670 (1 мкг/мкл), 20 е.а. эндонуклеазы рестрикции SmaI в буфере, содержащем 33 мМ Трис-ацетат, рН 7.9, 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия, 1 мМ дитиотреит. Реакцию проводили 2 ч при 25 °С. По окончании реакции объем реакционной смеси доводили до 100 мкл

добавлением воды и последовательно экстрагировали смесью фенол:хлороформ (1:1 v/v, 100 мкл), затем хлороформом (два раза по 100 мкл). ДНК осаждали C_2H_5OH в присутствии 0.3 М NaOAc, pH 5.2 и инкубировали 30 мин при $-20\text{ }^{\circ}C$. ДНК отделяли центрифугированием (13400 оборотов/мин, 15 мин), осадок промывали 75%-ным C_2H_5OH и сушили на воздухе, а затем растворяли в 6 мкл H_2O .

Реакцию синтеза РНК проводили с использованием TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit в соответствии с протоколом для данного набора при концентрации нуклеозидтрифосфатов 10 мМ. Объем реакционной смеси доводили до 100 мкл добавлением H_2O , и последовательно экстрагировали смесью фенол:хлороформ (1:1 v/v, 100 мкл), затем хлороформом (100 мкл \times 2). РНК осаждали C_2H_5OH в присутствии 0.3 М NaOAc, pH 5.2 в течение 2 ч при $-20\text{ }^{\circ}C$. Осадок РНК отделяли центрифугированием (14000 оборотов/мин, 15 мин, $4\text{ }^{\circ}C$), осадок промывали 75%-ным C_2H_5OH , сушили на воздухе и растворяли в 20 мкл H_2O *mq*. Очистку полученного РНК-транскрипта от примеси нуклеозидтрифосфатов, не включившихся в цепь проводили с использованием колонок для очистки РНК-транскрипта Micro Bio-Spin[®] 30, в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

3.3.23. Исследование связывания 2'-биспиренильных зондов с модельными короткими НК-мишенями и с *in vitro* РНК-транскриптом гена *mdr1* методом флуориметрического титрования

Связывание биспиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) с модельными НК-мишенями (*RNA1*, *RNA2*, *RNA3*, *DNA1* и *DNA2*) проводили при температуре $25\text{ }^{\circ}C$ в 250 мкл буфера, содержащего 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (pH 7.4), 1 мМ Na_2EDTA при концентрации зондов $1\cdot 10^{-7}$ М. К раствору 2'-биспиренильного конъюгата олигонуклеотида ($1\cdot 10^{-7}$ М) добавляли НК-мишень (*RNA1*, *RNA2*, *RNA3*, *DNA1* и *DNA2*) в концентрациях от $1\cdot 10^{-9}$ до $5\cdot 10^{-7}$ М. Изменения флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Carry Eclipse, при длине волны возбуждения флуоресценции 345 нм. Цифровую обработку полученных данных проводили с использованием программного пакета OriginPro 8 (OriginLab corporation, США).

3.3.24. Расчет термодинамических констант связывания олигонуклеотидов с РНК

Определение кажущихся констант связывания проводили путем минимизации среднеквадратического отклонения параметра K_x модифицированного уравнения (2), описывающего изменение флуоресценции олигонуклеотидного зонда от концентрации РНК-мишени:

$$\Delta F = \frac{K_x \cdot [\text{РНК}] \cdot (F_k - F_0)}{1 + K_x \cdot [\text{РНК}]}, \quad (2)$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции пирена (378 нм или 480 нм) свободного олигонуклеотидного зонда;

F_k – интенсивность флуоресценции пирена (378 нм или 480 нм) олигонуклеотидного зонда в комплексе с РНК;

ΔF – изменение интенсивности флуоресценции зонда при добавлении РНК-мишени;

$[\text{РНК}]$ – концентрация РНК-мишени;

K_x – эффективная константа связывания зонда с мишенью.

3.3.25. Исследование связывания 5'-биспиренильных зондов типа «молекулярный маяк» с модельной 43-звенной РНК-мишенью (*RNA4*)

Для исследования гибридизации пиренильных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) с РНК методом флуориметрического титрования к раствору флуоресцентно-меченого олигонуклеотида ($1 \cdot 10^{-6}$ М) порционно добавляли раствор РНК-мишени *RNA4* в повышающихся концентрациях – от $1 \cdot 10^{-7}$ М до $4 \cdot 10^{-6}$ М. Изменения флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Carry Eclipse, при длине волны возбуждения флуоресценции 345 нм. Для обработки экспериментальных данных использовали программу GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США). Определение эффективных констант диссоциации проводили путем минимизации среднеквадратического отклонения параметра K_d уравнения (1), описывающего изменение флуоресценции олигонуклеотидного зонда от концентрации РНК-мишени:

$$\Delta F = \frac{[\text{РНК}] \cdot F_k}{K_d + [\text{РНК}]}, \quad (1)$$

F_k – интенсивность мономерной флуоресценции (380 нм) олигонуклеотидного зонда в комплексе с РНК;

ΔF – изменение интенсивности мономерной флуоресценции зонда при добавлении РНК-мишени;

$[\text{РНК}]$ – концентрация РНК-мишени;

K_d – эффективная константа диссоциации комплекса зонда с РНК-мишенью.

3.3.26. Определение квантовых выходов флуоресценции биспиренильных зондов и их дуплексов с РНК-мишенями

Квантовые выходы испускания флуоресценции (Φ_F) 2'- и 5'-биспиренильных зондов были определены с использованием 9,10-дифенилантрацена (DPA) в циклогексане ($\Phi_F = 1.00$) в

качестве стандарта, как описано в [6]. В качестве внутреннего стандарта для кросс-калибровки был выбран антрацен в циклогексане, квантовый выход которого по литературным данным равен 0.36 [235]. Для определения квантового выхода антрацена в циклогексане относительно DPA в циклогексане, были записаны спектры поглощения (в диапазоне 300-400 нм) и испускания флуоресценции (при возбуждении на длине волны 345 нм в диапазоне 360-600 нм) растворов с оптической плотностью 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 и 0.1 на длине волны 345 нм. Расчет значения квантового выхода флуоресценции определяемых веществ проводили как описано в [6], по формуле:

$$\Phi_F(f) = \Phi_F(ref) \times \frac{\alpha(f)}{\alpha(ref)} \times \left[\frac{\eta(f)}{\eta(ref)} \right]^2$$

где $\Phi_F(ref)$ – значение квантового выхода флуоресценции DPA в циклогексане в качестве стандарта, $\alpha(f)$ и $\alpha(ref)$ – значения тангенса угла наклона аппроксимирующей кривой, построенной на графике зависимости интеграла флуоресценции от поглощения на длине волны 345 нм для определяемого вещества и DPA, соответственно, $\eta(f)$ и $\eta(ref)$ – коэффициенты преломления растворителя определяемого вещества и DPA, соответственно. Значения квантовых выходов флуоресценции пиренильных конъюгатов олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов) проводили аналогично описанной выше методике. Значения коэффициентов преломления воды и циклогексана - 1.3436 и 1.4262, соответственно.

Полученные значения квантовых выходов флуоресценции 2'- и 5'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов) представлены в таблицах 2.7 и 2.16, соответственно.

3.3.27. Компьютерное моделирование и исследование молекулярной динамики дуплексов тандемных монопиренильных зондов, состоящих из 5'- и 3'-пиренильных конъюгатов олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов), с РНК-мишенью

Компьютерное моделирование молекулярной динамики дуплексов тандемных монопиренильных зондов с 43-звенной модельной РНК-мишенью **RNA4** выполнено совместно с к.ф.-м.н. А.А. Ломзовым (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН).

Компьютерные модели дуплексов пиренильных зондов с РНК-мишенью были построены с использованием программного пакета AMBER12 [239], как описано в [254], с небольшими изменениями. В качестве силового поля было использовано ff12SB. Пространственные структуры и библиотеки файлов пиреновых остатков с разными линкерами были сгенерированы с использованием программного пакета AmberTools 12. Частичные заряды на атомах были рассчитаны в программе Gaussian 09 с использованием метода Хартри-Фока и 6-31G* базисного комплекта с оптимизацией структуры. Известно, что дуплексы 2'-O-метил

РНК/РНК сходны по строению с А-формой дуплекса, свойственной гибридам РНК/РНК, все дуплексы тандемных пиренильных зондов с РНК-мишенью были построены в А-форме. Было запущено девять серий моделирования молекулярной динамики (МД) с разным распределением начальных скоростей атомов в неявной водной оболочке. Каждая серия включала 11 стадий:

1) преобразование файлов с расширением *.pdb с параметрами дуплексов тандемных пиренильных конъюгатов 2'-O-метил РНК/РНК в формат программы AMBER7 в условиях явной водной оболочки (tleap, AMBERTools 12),

2) минимизация энергии дуплексов тандемных пиренильных конъюгатов 2'-O-метил РНК/РНК при температуре 1 К (PMEMD.CUDA, AMBER12),

3) нагревание дуплексов до 300 К в течение 2.5 нс (PMEMD.CUDA, AMBER12),

4) релаксация системы в течение 1 нс при 300 К (PMEMD.CUDA, AMBER12),

5) создание файла в формате *.pdb релаксированной структуры (ambpdb, AMBERTools 12),

6) добавление водной оболочки (TIP3P water, 12 Å) и ионов натрия для нейтрализации заряда дуплекса и преобразование файла в формат программы Amber7 (tleap, AMBERTools 12),

7) минимизация энергии всех системы с фиксированным дуплексом (силовая константа была 500 калл/моль/Å²) при 1 К (PMEMD.MPI, AMBER12),

8) нагревание системы до 300 К в течение 2.5 нс с шагом 0.0005 пс с фиксированным дуплексом (силовая константа была 500 калл/моль/Å²) (PMEMD.MPI, AMBER12).

9) релаксация плотности системы в постоянном объеме в течение 500 пс (PMEMD.MPI, AMBER12).

10) релаксация плотности системы при постоянном давлении в течение 500 пс (PMEMD.MPI, AMBER12).

11) расчет эффективной МД траектории, 80 нс (PMEMD.MPI, AMBER12).

Расчет МД траекторий был выполнен в явной водной оболочке (стадии 2-4), шаг интегрирования был равен 1 фс. МД траектории были сгенерированы в NTV ансамбли. Была использована Андерсеновская схема регуляции (сильные столкновения). Для расчета функции потенциала концентрация соли подвижных противоионов в растворе была принята за 0.1 М (использовали модифицированную обобщенную теорию Борна, основанную на предельном законе Дебая-Хюккеля для скрининга ионных взаимодействий). Был использован SHAKE алгоритм для расчета всех химических связей, включая водородные связи. Координаты каждого атома системы (снимки) сохраняли каждую 1 пс.

Финальная стадия расчета МД дуплексов была выполнена в явной водной оболочке. Ионы Na⁺ (18-22 штук) добавляли в систему для нейтрализации заряда. Были использованы

периодические граничные условия, NTP ансамбль с изотропным расположением при 300 К и Андерсеновской температурной схемой связи. Был использован метод вычисления энергии взаимодействия периодических систем по Эвальду (PME) со срезом 8 Å. Был использован SHAKE алгоритм для расчета всех химических связей, включая водородные связи. Был использован временной шаг 2 фс. Поступательные и вращательные движения центра масс удаляли каждые 1 пс.

Суммарная площадь поверхности двух соседних остатков пирена в стыке была рассчитана в программе ptraj (AmberTools 12). Распределения вероятностей значения суммарной площади поверхности вдоль всей МД траектории (9 серий) были построены в программном пакете Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

3.3.28. Визуализация внутриклеточной РНК-мишени с использованием пиренильных зондов методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (РНК FISH)

Клеточная линия

Линия клеток почек эмбриона человека, HEK293 Phoenix, была любезно предоставлена профессором, д.б.н. О.Л. Серовым (Институт цитологии и генетики СО РАН). Клетки культивировали в модифицированной культуральной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин и 100 единиц пенициллин/стрептомицин (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA). Клетки культивировали в инкубаторе при 37 °С в атмосфере воздуха, содержащего 5% CO₂.

Визуализация 28S рибосомальной РНК в фиксированных клетках линии HEK293 Phoenix

Клетки линии HEK293 Phoenix культивировали в 10 % FBS/DMEM в течение 24 ч на поверхности желатин-обработанных покровных стекол (круглые, d=13 мм, Thermo Fisher Scientific, Германия) в 24-луночных планшетах. Клетки фиксировали 4 % параформальдегидом в фосфатном буфере (10 mM фосфат натрия, pH 7.4, 100 mM NaCl) в течение 10 мин при комнатной температуре и дважды отмывали фосфатным буфером. Проницаемость фиксированных клеток увеличивали обработкой клеток детергентом Triton×100 в течение 3 мин при комнатной температуре, а затем промывали клетки фосфатным буфером 3 раза. Фиксированные клетки обрабатывали раствором эквимольной смеси монопиренильных тандемных зондов (**1T1** и **2T1** или **1T1** и **2T4**) или раствором зонда типа “молекулярный маяк” (**MB1** или **MB4**) в течение 30 мин при 37 °С. В качестве референсного зонда использовали Су3-меченый олиго(2'-O-метилрибонуклеотид **U3-Cy3** (5'-Cy3-m(GGCUUCACGCUCAGG)), комплементарный фрагменту 205-221 нт U3 мяРНК [219]. Концентрация каждого олигонуклеотида в фосфатном буфере была 1 мкМ). Затем фиксированные клетки трижды

отмывали фосфатным буфером и обрабатывали 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан в качестве агента, предотвращающего выцветание флуорофоров в пробах.

Обработка фиксированных клеток линии HEK293 Phoenix РНКазой А

РНКазу А (0.5 мг/мл в фосфатном буфере (10 мМ фосфат натрия, рН 7.4, 100 мМ NaCl)) добавляли к фиксированным клеткам и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Клетки трижды промывали фосфатным буфером и повторно фиксировали 4 % параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре и затем трижды промывали фосфатным буфером. Фиксированные клетки обрабатывали 1 мкМ раствором зонда в фосфатном буфере в течение 30 мин при 37 °С. Затем обрабатывали клетки раствором эквимольной смеси моно-пиренильных тандемных зондов (*1T1* и *2T1* или *1T1* и *2T4*) или зонда типа “молекулярный маяк” (*MB1* или *MB4*). В качестве референсного зонда использовали Су3-меченый олиго(2'-О-метилрибонуклеотид **U3-Су3**, комплементарный фрагменту 205-221 нт U3 мяРНК. Затем фиксированные клетки трижды отмывали фосфатным буфером и обрабатывали 1,4-диазабицикло[2.2.2]октаном.

Конфокальная микроскопия

Флуоресцентный сигнал в клетках регистрировали методом флуоресцентной микроскопии на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 NLO Zeiss на базе микроскопа AxioObserver Z1, оснащенный диодным (405 нм) и аргоновым (514 нм) лазерами, объективами Plan APOCHROMAT 20×/0.8, EC Plan NEOFLUAR 40×/1.3 и Plan APOCHROMAT 63×/1.4 Oil DIC и цифровой камерой AxioCam MRm (Zeiss, Германия). Для визуализации флуоресцентных олигонуклеотидных зондов, гибридизованных с РНК-мишенью в клетках, возбуждали флуоресценцию на двух длинах волн 405 нм (канал пирена, испускание флуоресценции пирена регистрировали в диапазоне 450-495 нм) и 514 нм (канал цианинового красителя Су3, испускание флуоресценции Су3 регистрировали в диапазоне 570-630 нм). Изображения клеток были получены и проанализированы с использованием программного пакета ZEN 2012 software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Все изображения были получены в шкале оттенков серой и затем были преобразованы в синий и красный псевдо-цвета. Полученные изображения представлены на рисунках 2.28 и 2.38.

ВЫВОДЫ

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

1. Созданы новые линейные эксимер-образующие флуоресцентные зонды на основе устойчивых в биологических средах конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с одиночными и множественными (до трех) 2'-биспиренильными группировками и 3'-концевым «инвертированным» тимидином, комплементарных мРНК гена *mdr1*. Было показано, что наличие динуклеотидов СС, СG или UC с 3'-стороны от 2'-модифицированного нуклеотида оказывает положительное влияние на интенсивность эксимерной флуоресценции комплексов зондов с РНК-мишенью. Продемонстрирована возможность детекции протяженной РНК с использованием созданных линейных 2'-биспиренильных зондов.
2. Получены новые эксимер-образующие тандемные зонды, содержащие два монопиренильных остатка на стыке компонентов, введенные на 5'-конец одного и на 3'-конец другого компонента посредством линкеров различного строения, обладающие высоким сродством и специфичностью к комплементарной РНК-мишени. Выяснено, что наиболее важным параметром в дизайне таких зондов является длина линкера, посредством которого введен пиренильный остаток на 3'-конец компонента зонда; для эффективного образования эксимера необходим линкер минимальной длины. Этот вывод подтвержден результатами расчетов, полученными с использованием методов молекулярной динамики.
3. Созданы новые зонды типа «молекулярный маяк», содержащие 5'-биспиренильную группу и тушитель флуоресценции ВНQ1 на 3'-конце. Показано, что наибольшей чувствительностью обладают зонды, при гибридизации которых с РНК-мишенью 5'-биспиренильная группировка располагается в непосредственной близости от дуплекса, а не на «свисающем» конце.
4. Продемонстрирована возможность визуализации 28S рРНК в клетках с использованием созданных тандемных зондов и зондов типа «молекулярный маяк».

Список литературы

1. Kellogg R.E., Bennett R.G. Radiationless intermolecular energy transfer. III. Determination of phosphorescence efficiencies // *J. Chem. Phys.* - 1964. - V. 41. - N. 10. - P. 3042–3045.
2. Ulrich G., Ziessel R., Harriman A. The chemistry of fluorescent Bodipy dyes: versatility unsurpassed // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2008. - V. 47. - N. 7. - P. 1184–1201.
3. Kubin R.F., Fletcher A.N. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes // *J. Lumin.* - 1982. - V. 27. - N. 4. - P. 455–462.
4. Romieu A., Brossard D., Hamon M., Outaabout H., Portal C., Renard P.-Y. Postsynthetic derivatization of fluorophores with α -sulfo- β -alanine dipeptide linker. Application to the preparation of water-soluble cyanine and rhodamine dyes // *Bioconjugate Chem.* - 2008. - V. 19. - N. 1. - P. 279–289.
5. Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis C.J., Waggoner A.S. Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters // *Bioconjugate Chem.* - 1993. - V. 4. - N. 2. - P. 105–111.
6. Berlman I.B. Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules / I.B. Berlman. - 2nd Edn. - New York: Academic Press, 1971. - 473 p.
7. Gonçalves M.S.T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes // *Chem. Rev.* - 2009. - V. 109. - N. 1. - P. 190–212.
8. Østergaard M.E., Hrdlicka P.J. Pyrene-functionalized oligonucleotides and locked nucleic acids (LNAs): tools for fundamental research, diagnostics, and nanotechnology // *Chem. Soc. Rev.* - 2011. - V. 40. - N. 12. - P. 5771–5788.
9. Karuppanan S., Chambron J.-C. Supramolecular chemical sensors based on pyrene monomer-excimer dual luminescence // *Chem. - An Asian J.* - 2011. - V. 6. - N. 4. - P. 964–984.
10. Jones C.M., Asher S.A. Ultraviolet resonance Raman study of the pyrene S_4 , S_3 , and S_2 excited electronic states // *J. Chem. Phys.* - 1988. - V. 89. - N. 5. - P. 2649–2661.
11. Winnik F.M. Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media // *Chem. Rev.* - 1993. - V. 93. - N. 2. - P. 587–614.
12. Nakamura M., Fukunaga Y., Sasa K., Ohtoshi Y., Kanaori K., Hayashi H., Nakano H., Yamana K. Pyrene is highly emissive when attached to the RNA duplex but not to the DNA duplex: the structural basis of this difference // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - V. 33. - N. 18. - P. 5887–5895.
13. Guckian K.M., Schweitzer B.A., Ren R.X.F., Sheils C.J., Tahmassebi D.C., Kool E.T. Factors contributing to aromatic stacking in water: Evaluation in the context of DNA // *J. Am. Chem. Soc.* - 2000. - V. 122. - N. 10. - P. 2213–2222.
14. Cho N., Asher S.A. UV resonance Raman studies of DNA-pyrene interactions: optical decoupling Raman spectroscopy selectively examines external site bound pyrene // *J. Am. Chem. Soc.* - 1993. - V. 115. - N. 14. - P. 6349–6356.
15. Birks J.B. Excimers // *Reports Prog. Phys.* - 1975. - V. 903. - N. 38. - P. 903–974.
16. Yao C., Kraatz H.-B., Steer R.P. Photophysics of pyrene-labelled compounds of biophysical interest // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2005. - V. 4. - N. 2. - P. 191–199.
17. Kalyanasundaram K., Thomas J.K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems // *J. Am. Chem. Soc.* - 1977. - V. 99. - N. 7. - P. 2039–2044.

18. Kostenko E., Dobrikov M., Pyshnyi D., Petyuk V., Komarova N., Vlassov V., Zenkova M. 5'-Bis-pyrenylated oligonucleotides displaying excimer fluorescence provide sensitive probes of RNA sequence and structure // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - V. 29. - N. 17. - P. 3611–3620.
19. Masuko M., Ohtani H., Ebata K., Shimadzu A. Optimization of excimer-forming two-probe nucleic acid hybridization method with pyrene as a fluorophore. // *Nucleic Acids Res.* - 1998. - V. 26. - N. 23. - P. 5409–5416.
20. Wu C., Wang C., Yan L., Yang C.J. Pyrene excimer nucleic acid probes for biomolecule signaling // *J. Biomed. Nanotech.* - 2009. - V. 5. - N. 5. - P. 495–504.
21. Martinho J.M.G., Reise Sousa A.T., Oliveira Torres M.E., Fedorov A. Fluorescence quenching of pyrene monomer and excimer by CH₃I // *Chem. Phys.* - 2001. - V. 264. - N. 1. - P. 111–121.
22. Manoharan M., Tivel K.L., Zhao M., Nafisi K., Netzel T.L. Base-sequence dependence of emission lifetimes for DNA oligomers and duplexes covalently labeled with pyrene: relative electron-transfer quenching efficiencies of A, G, C, and T nucleosides toward pyrene // *J. Phys. Chem.* - 1995. - V. 99. - N. 48. - P. 17461–17472.
23. Amann N., Pandurski E., Fiebig T., Wagenknecht H.-A. Electron Injection into DNA: synthesis and spectroscopic properties of pyrenyl-modified oligonucleotides // *Chem. - A Eur. J.* - 2002. - V. 8. - N. 21. - P. 4877–4883.
24. Valis L., Mayer-Enthart E., Wagenknecht H.-A. 8-(Pyren-1-yl)-2'-deoxyguanosine as an optical probe for DNA hybridization and for charge transfer with small peptides // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2006. - V. 16. - N. 12. - P. 3184–3187.
25. Raytchev M., Mayer E., Amann N., Wagenknecht H.-A., Fiebig T. Ultrafast proton-coupled electron-transfer dynamics in pyrene-modified pyrimidine nucleosides: model studies towards an understanding of reductive electron transport in DNA // *ChemPhysChem.* - 2004. - V. 5. - N. 5. - P. 706–712.
26. Wanninger-Weiß C., Wagenknecht H.-A. Synthesis of 5-(2-pyrenyl)-2'-deoxyuridine as a DNA modification for electron-transfer studies: the critical role of the position of the chromophore attachment // *Eur. J. Org. Chem.* - 2008. - V. 2008. - N. 1. - P. 64–71.
27. Astakhova I. V, Korshun V.A., Wengel J. Highly fluorescent conjugated pyrenes in nucleic acid probes: (phenylethynyl)pyrenecarbonyl-functionalized locked nucleic acids // *Chemistry.* - 2008. - V. 14. - N. 35. - P. 11010–11026.
28. Trifonov A., Raytchev M., Buchvarov I., Rist M., Barbaric J., Wagenknecht, H.-A. Fiebig A. T Ultrafast energy transfer and structural dynamics in DNA // *J. Phys. Chem. B* - 2005. - V. 109. - N. 41. - P. 19490-19495.
29. Mayer E., Valis L., Wagner C., Rist M., Amann N., Wagenknecht H.-A. 1-Ethynylpyrene as a tunable and versatile molecular beacon for DNA // *ChemBioChem.* - 2004. - V. 5. - N. 6. - P. 865–868.
30. Mayer E., Valis L., Huber R., Amann N., Wagenknecht H.-A. Preparation of pyrene-modified purine and pyrimidine nucleosides via Suzuki-Miyaura cross-couplings and characterization of their fluorescent properties // *Synthesis* - 2003. - V. 2003. - N. 15. - P. 2335–2340.
31. Коршун В.А., Манасова Е.В., Балакин К.В., Прохоренко И.А., Бучацкий А.Г., Берлин Ю.А. 5-(1-Пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридин, новое флуоресцентное нуклеозидное производное // *Биоорганическая химия.* - 1996. - V. 22. - N. 12. - P. 923–925.
32. Малахов А.Д., Малахова Е.В., Кузнецова С.В., Гречишников И.В., Прохоренко И.А., Скоробогатый М.В., Коршун В.А., Берлин Ю.А. Синтез и флуоресцентные свойства 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридинсодержащих олигодезоксинуклеотидов // *Биоорганическая химия.* - 2000. - V. 26. - N. 1. - P. 39–50.

33. Barbaric J., Wagenknecht H.-A. DNA as a supramolecular scaffold for the helical arrangement of a stack of 1-ethynylpyrene chromophores // *Org. Biomol. Chem.* - 2006. - V. 4. - N. 11. - P. 2088–2090.
34. Seo Y.J., Hwang G.T., Kim B.H. Quencher-free molecular beacon systems with two pyrene units in the stem region // *Tetrahedron Lett.* - 2006. - V. 47. - N. 24. - P. 4037–4039.
35. Seo Y.J., Ryu J.H., Kim B.H. Quencher-free, end-stacking oligonucleotides for probing single-base mismatches in DNA // *Org. Lett.* - 2005. - V. 7. - N. 22. - P. 4931–4933.
36. Skorobogatyi M. V., Malakhov A.D., Pchelintseva A.A., Turban A.A., Bondarev S.L., Korshun V.A. Fluorescent 5-alkynyl-2'-deoxyuridines: high emission efficiency of a conjugated perylene nucleoside in a DNA duplex // *ChemBioChem.* - 2006. - V. 7. - N. 5. - P. 810–816.
37. Ochi Y., Okamoto A., Saito I. Fluorescent probe for the detection of DNA conformational transition // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* - 2004. - N. 48. - P. 73–74.
38. Kaura M., Kumar P., Hrdlicka P.J. Synthesis, hybridization characteristics, and fluorescence properties of oligonucleotides modified with nucleobase-functionalized locked nucleic acid adenosine and cytidine monomers // *J. Org. Chem.* - 2014. - V. 79. - N. 13. - P. 6256–6268.
39. Ostergaard M.E., Guenther D.C., Kumar P., Baral B., Deobald L., Paszczyński A.J., Sharma P.K., Hrdlicka P.J. Pyrene-functionalized triazole-linked 2'-deoxyuridines – probes for discrimination of single nucleotide polymorphisms (SNPs) // *Chem. Commun.* - 2010. - V. 46. - N. 27. - P. 4929–4931.
40. Seela F., Ingale S.A. “Double click” reaction on 7-deazaguanine DNA: synthesis and excimer fluorescence of nucleosides and oligonucleotides with branched side chains decorated with proximal pyrenes // *J. Org. Chem.* - 2010. - V. 75. - N. 2. - P. 284–295.
41. Kumar P., Baral B., Anderson B. a., Guenther D.C., Ostergaard M.E., Sharma P.K., Hrdlicka P.J. C5-alkynyl-functionalized α -L-LNA: synthesis, thermal denaturation experiments and enzymatic stability // *J. Org. Chem.* - 2014. - V. 79. - N. 11. - P. 5062–5073.
42. Ingale S.A., Pujari S.S., Sirivolu V.R., Ding P., Xiong H., Mei H., Seela F. 7-Deazapurine and 8-aza-7-deazapurine nucleoside and oligonucleotide pyrene conjugates: synthesis, nucleobase controlled fluorescence quenching, and duplex stability // *J. Org. Chem.* - 2012. - V. 77. - N. 1. - P. 188–199.
43. Bag S.S., Kundu R., Matsumoto K., Saito Y., Saito I. Singly and doubly labeled base-discriminating fluorescent oligonucleotide probes containing oxo-pyrene chromophore // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2010. - V. 20. - N. 11. - P. 3227–3230.
44. Dohno C., Saito I. Discrimination of single-nucleotide alterations by G-specific fluorescence quenching // *ChemBioChem.* - 2005. - V. 6. - N. 6. - P. 1075–1081.
45. Kaura M., Kumar P., Guenther D.C., Anderson B.A., Ytreberg F.M., Deobald L., Paszczyński A.J., Sharma P.K., Hrdlicka P.J. Synthesis and hybridization properties of oligonucleotides modified with 5-(1-aryl-1,2,3-triazol-4-yl)-2'-deoxyuridines // *Org. Biomol. Chem.* - 2012. - V. 10. - N. 43. - P. 8575–8578.
46. Kaura M., Hrdlicka P.J. Locked nucleic acid (LNA) induced effect on the hybridization and fluorescence properties of oligodeoxyribonucleotides modified with nucleobase-functionalized DNA monomers // *Org. Biomol. Chem.* - 2015. - V. 13. - N. 26. - P. 7236–7247.
47. Mayer-Enthart E., Wagenknecht H.-A. Structure-sensitive and self-assembled helical pyrene array based on DNA architecture // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2006. - V. 45. - N. 20. - P. 3372–3375.

48. Mayer-Enthart E., Wagner C., Barbaric J., Wagenknecht H.A. Helical self-assembled chromophore clusters based on DNA-like architecture // *Tetrahedron*. - 2007. - V. 63. - N. 17. - P. 3434–3439.
49. Saito Y., Kanatani K., Ochi Y., Okamoto A., Saito I. Design of base-discriminating fluorescent (BDF) nucleobase for SNP typing // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*. - 2004. - N. 48. - P. 243–244.
50. Trifonov A., Raytchev M., Buchvarov I., Rist M., Barbaric J., Wagenknecht H.-A., Fiebig T. Ultrafast energy transfer and structural dynamics in DNA. // *J. Phys. Chem. B*. - 2005. - V. 109. - N. 41. - P. 19490–19495.
51. Saito Y., Miyauchi Y., Okamoto A., Saito I. Synthesis and properties of novel base-discriminating fluorescent (BDF) nucleosides: a highly polarity-sensitive fluorophore for SNP typing // *Tetrahedron Lett*. - 2004. - V. 45. - N. 42. - P. 7827–7831.
52. Kaura M., Hrdlicka P.J. Efficient discrimination of single nucleotide polymorphisms (SNPs) using oligonucleotides modified with C5-pyrene-functionalized DNA and flanking locked nucleic acid (LNA) monomers // *Chem. - An Asian J*. - 2016. - V. 11. - N. 9. - P. 1366–1369.
53. Kumar P., Ostergaard M.E., Baral B., Anderson B.A., Guenther D.C., Kaura M., Raible D.J., Sharma P.K., Hrdlicka P.J. Synthesis and biophysical properties of C5-functionalized LNA (Locked Nucleic Acid) // *J. Org. Chem*. - 2014. - V. 79. - N. 11. - P. 5047–5061.
54. Kumar P., Baral B., Anderson B.A., Guenther D.C., Østergaard M.E., Sharma P.K., Hrdlicka P.J. C5-Alkynyl-functionalized α -L-LNA: synthesis, thermal denaturation experiments and enzymatic stability // *J. Org. Chem*. - 2014. - V. 79. - N. 11. - P. 5062–5073.
55. Perlíková P., Karlsen K.K., Pedersen E.B., Wengel J. Unlocked nucleic acids with a pyrene-modified uracil: Synthesis, hybridization studies, fluorescent properties and i-motif stability // *ChemBioChem*. - 2014. - V. 15. - N. 1. - P. 146–156.
56. Perlíková P., Ejlersen M., Langkjaer N., Wengel J. Bis-pyrene-modified unlocked nucleic acids: synthesis, hybridization studies, and fluorescent properties // *ChemMedChem*. - 2014. - V. 9. - N. 9. - P. 2120–2127.
57. Förster U., Grünwald C., Engels J.W., Wachtveitl J. Ultrafast dynamics of 1-ethynylpyrene-modified RNA: a photophysical probe of intercalation // *J. Phys. Chem. B*. - 2010. - V. 114. - N. 35. - P. 11638–11645.
58. Kubota M., Kosuge M., Ono A. Helix formation of oligodeoxyribonucleotides containing base-aromatic ring conjugates // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*. - 2003. - V. 3. - N. 1. - P. 77.
59. Joo H.N., Seo Y.J. Single excitation three color folded DNA probe for SNP typing // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. - 2015. - V. 25. - N. 22. - P. 5286–5290.
60. Matsumoto K., Shinohara Y., Bag S.S., Takeuchi Y., Morii T., Saito Y., Saito I. Pyrene-labeled deoxyguanosine as a fluorescence sensor to discriminate single and double stranded DNA structures: design of ends free molecular beacons // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. - 2009. - V. 19. - N. 22. - P. 6392–6395.
61. Seo Y.J., Jeong H.S., Bang E.-K., Hwang G.T., Jung J.H., Jang S.K., Kim B.H. Cholesterol-linked fluorescent molecular beacons with enhanced cell permeability // *Bioconjugate Chem*. - 2006. - V. 17. - N. 5. - P. 1151–1155.
62. Wagner C., Rist M., Mayer-Enthart E., Wagenknecht H.-A. 1-Ethynylpyrene-modified guanine and cytosine as optical labels for DNA hybridization // *Org. Biomol. Chem*. - 2005. - V. 3. - N. 11. - P. 2062–2063.

63. Wanninger-Weiß C., Valis L., Wagenknecht H.-A. Pyrene-modified guanosine as fluorescent probe for DNA modulated by charge transfer // *Bioorg. Med. Chem.* - 2008. - V. 16. - N. 1. - P. 100–106.
64. Ingale S.A., Seela F. Stepwise click functionalization of DNA through a bifunctional azide with a chelating and a nonchelating azido group // *J. Org. Chem.* - 2013. - V. 78. - N. 7. - P. 3394–3399.
65. Ingale S.A., Leonard P., Yang H., Seela F. 5-Nitroindole oligonucleotides with alkynyl side chains: universal base pairing, triple bond hydration and properties of pyrene “click” adducts // *Org. Biomol. Chem.* - 2014. - V. 12. - N. 42. - P. 8519–8532.
66. Ono A., Dan A., Matsuda A. Synthesis of oligonucleotides carrying linker groups at 1'-position of sugar residues // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* - 1993. - N. 29. - P. 13–14.
67. Grünefeld P., Richert C. Synthesis of a 1'-Aminomethylthymidine and Oligodeoxyribonucleotides with 1'-Acylamidomethylthymidine Residues // *J. Org. Chem.* - 2004. - V. 69. - P. 7543–7551.
68. Ren R.X.F., Chaudhuri N.C., Paris P.L., Rumney IV S., Kool E.T. Naphthalene, phenanthrene, and pyrene as DNA base analogues: synthesis, structure, and fluorescence in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* - 1996. - V. 118. - N. 33. - P. 7671–7678.
69. Moran S., Ren R.X.-F., Sheils C.J., Rumney S., Kool E.T. Non-Hydrogen Bonding “Terminator” Nucleosides Increase the 3'-end Homogeneity of Enzymatic RNA and DNA Synthesis // *Nucleic Acids Res.* - 1996. - V. 24. - N. 11. - P. 2044-2052.
70. Paris P.L., Langenhan J.M., Kool E.T. Probing DNA sequences in solution with a monomer-excimer fluorescence color change // *Nucleic Acids Res.* - 1998. - V. 26. - N. 16. - P. 3789–3793.
71. Koo C.-K., Wang S., Gaur R.L., Samain F., Banaei N., Kool E.T. Fluorescent DNA chemosensors: identification of bacterial species by their volatile metabolites // *Chem. Commun.* - 2011. - V. 47. - N. 41. - P. 11435-11437.
72. Ono T., Edwards S.K., Wang S., Jiang W., Kool E.T. Monitoring eukaryotic and bacterial UDG repair activity with DNA-multifluorophore sensors // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - V. 41. - N. 12. - P. e127.
73. Matray T.J., Kool E.T. Selective and stable DNA base pairing without hydrogen bonds // *J. Am. Chem. Soc.* - 1998. - V. 120. - N. 24. - P. 6191–6192.
74. Smirnov S., Matray T.J., Kool E.T., de los Santos C. Integrity of duplex structures without hydrogen bonding: DNA with pyrene paired at abasic sites // *Nucleic Acids Res.* - 2002. - V. 30. - N. 24. - P. 5561–5569.
75. Babu B.R., Prasad A.K., Trikha S., Thorup N., Parmar V.S., Wengel J., Imanishi T., Rajwanshi V.K., Bryld T., Jacobsen J.P., Jacobsen N., Olsen C.E. Conformationally locked aryl C-nucleosides: synthesis of phosphoramidite monomers and incorporation into single-stranded DNA and LNA (locked nucleic acid) // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* - 2002. - V. 46. - N. 22. - P. 2509–2519.
76. Raunak R., Ravindra Babu B., Sørensen M.D., Parmar V.S., Harrit N.H., Wengel J., Murakami A., Wengel J. Oligodeoxynucleotides containing α -L-ribo configured LNA-type C-aryl nucleotides // *Org. Biomol. Chem.* - 2004. - V. 2. - N. 1. - P. 80–89.
77. Wilson J.N., Teo Y.N., Kool E.T. Efficient quenching of oligomeric fluorophores on a DNA backbone // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129. - N. 50. - P. 15426–15427.

78. Teo Y.N., Kool E.T. Polyfluorophore excimers and exciplexes as FRET donors in DNA // *Bioconjugate Chem.* - 2009. - V. 20. - N. 12. - P. 2371–2380.
79. Wilson J.N., Gao J., Kool E.T. Oligodeoxyfluorosides: strong sequence dependence of fluorescence emission // *Tetrahedron.* - 2007. - V. 63. - N. 17. - P. 3427–3433.
80. Cuppoletti A., Cho Y., Park J.S., Strässler C., Kool E.T. Oligomeric fluorescent labels for DNA // *Bioconjugate Chem.* - 2005. - V. 16. - N. 3. - P. 528–534.
81. Yamana K., Ohashi Y., Nunota K., Kitamura M., Nakano H., Sengen O., Shimidzu T. Synthesis of oligonucleotide derivatives with pyrene group at sugar fragment // *Tetrahedron Lett.* - 1991. - V. 32. - N. 44. - P. 6347–6350.
82. Iwase R., Tsuchida H., Yamaoka T., Yamana K., Murakami A. Study of RNA structure by pyrene-labeled oligonucleotides // *Nucleic Acids Symp Ser. (Oxf.)* - 1997. - N. 37. - P. 205–206.
83. Mahara A., Iwase R., Sakamoto T., Yamana K., Yamaoka T., Murakami A. Bispyrene-conjugated 2'-O-methyloligonucleotide as a highly specific RNA-recognition probe // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2002. - V. 41. - N. 19. - P. 3648–3650.
84. Mahara A., Iwase R., Sakamoto T., Yamaoka T., Yamana K., Murakami A. Detection of acceptor sites for antisense oligonucleotides on native folded RNA by fluorescence spectroscopy // *Bioorg. Med. Chem.* - 2003. - V. 11. - N. 13. - P. 2783–2790.
85. Nakamura M., Shimomura Y., Ohtoshi Y., Sasa K., Hayashi H., Nakano H., Yamana K. Pyrene aromatic arrays on RNA duplexes as helical templates // *Org. Biomol. Chem.* - 2007. - V. 5. - N. 12. - P. 1945–1951.
86. Yamana K., Iwase R., Furutani S., Tsuchida H., Zako H., Yamaoka T., Murakami A. 2'-Pyrene modified oligonucleotide provides a highly sensitive fluorescent probe of RNA // *Nucleic Acids Res.* - 1999. - V. 27. - N. 11. - P. 2387–2392.
87. Yamana K., Zako H., Asazuma K., Iwase R., Nakano H., Murakami A. Fluorescence detection of specific RNA sequences using 2'-pyrene-modified oligoribonucleotides // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2001. - V. 40. - N. 6. - P. 1104–1106.
88. Karmakar S., Anderson B.A., Rathje R.L., Andersen S., Jensen T.B., Nielsen P., Hrdlicka P.J. High-affinity DNA targeting using readily accessible mimics of N2'-functionalized 2'-amino- α -L-LNA // *J Org Chem.* - 2011. - V. 76. - N. 17. - P. 7119–7131.
89. Waki R., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A. Development of a system to sensitively and specifically visualize c-fos mRNA in living cells using bispyrene-modified RNA probes // *Chem. Commun.* - 2011. - V. 47. - N. 14. - P. 4204–4206.
90. Iwase R., Mahara A., Yamana K., Yamaoka T., Murakami A. Study on RNA structure by pyrene-labeled 2'-O-methyloligoribonucleotides // *Nucleic Acids Symp Ser. (Oxf.)* - 1999. - N. 42. - P. 115–116.
91. Karmakar S., Anderson B.A., Rathje R.L., Andersen S., Jensen T.B., Nielsen P., Hrdlicka P.J. High-Affinity DNA Targeting Using Readily Accessible Mimics of N2'-Functionalized 2'-Amino- α -L-LNA // *J. Org. Chem.* - 2011. - V. 76. - N. 17. - P. 7119–7131.
92. Anderson B. A., Karmakar S., Hrdlicka P.J. Mixed-sequence recognition of double-stranded DNA using enzymatically stable phosphorothioate invader probes // *Molecules.* - 2015. - V. 20. - N. 8. - P. 13780–13793.
93. Guenther D.C., Karmakar S., Hrdlicka P.J. Bulged Invader probes: activated duplexes for mixed-sequence dsDNA recognition with improved thermodynamic and kinetic profiles // *Chem. Commun.* - 2015. - V. 51. - N. 81. - P. 15051–15054.

94. Korshun V.A., Stetsenko D.A., Gait M.J. Novel uridin-2'-yl carbamates: synthesis, incorporation into oligodeoxyribonucleotides, and remarkable fluorescence properties of 2'-pyren-1-ylmethylcarbamate // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* - 2002. - N. 8. - P. 1092–1104.
95. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Shenkarev Z.O., Korshun V.A. Oligonucleotides containing new fluorescent 1-phenylethynylpyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene uridine-2'-carbamates: synthesis and properties // *Tetrahedron.* - 2004. - V. 60. - N. 21. - P. 4617–4626.
96. Korshun V.A., Stetsenko D.A., Gait M.J. Uridine 2'-carbamates: facile tools for oligonucleotide 2'-functionalization // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* - 2004. - V. 15. – N. 4.21. – P.4.21.1–4.21.26.
97. Astakhova I. V., Ustinov A. V., Korshun V.A., Wengel J. LNA for optimization of fluorescent oligonucleotide probes : improved spectral properties and target binding. - *Bioconjugate Chem.* - 2011. - V. 20. - N. 4. - P. 533-539.
98. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Gait M.J., Volynsky P.E., Efremov R.G., Korshun V.A. Pyrenemethyl ara-uridine-2'-carbamate: a strong interstrand excimer in the major groove of a DNA duplex. // *ChemBioChem.* - 2003. - V. 4. - N. 9. - P. 841–847.
99. Astakhova I. V., Malakhov A.D., Stepanova I.A., Ustinov A. V., Bondarev S.L., Paramonov A.S., Korshun V.A. 1-Phenylethynylpyrene (1-PEPy) as refined excimer forming alternative to pyrene: case of DNA major groove excimer // *Bioconjugate Chem.* - 2007. - V. 18. - N. 6. - P. 1972–1980.
100. Sørensen M.D., Petersen M., Wengel J. Functionalized LNA (locked nucleic acid): high-affinity hybridization of oligonucleotides containing N-acylated and N-alkylated 2'-amino-LNA monomers // *Chem. Commun.* - 2003. - N. 17. - P. 2130–2131.
101. Kumar T.S., Madsen A.S., Wengel J., Hrdlicka P.J. Synthesis and biophysical studies of N2'-functionalized 2'-amino-alpha-L-LNA // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2007. - V. 26. - N. 10-12. - P. 1403–1405.
102. Kumar T.S., Madsen A.S., Ostergaard M.E., Sau S.P., Wengel J., Hrdlicka P.J. Functionalized 2'-amino-alpha-L-LNA: directed positioning of intercalators for DNA targeting // *J. Org. Chem.* - 2009. - V. 74. - N. 3. - P. 1070–1081.
103. Ostergaard M.E., Cheguru P., Papasani M.R., Hill R.A., Hrdlicka P.J. Glowing locked nucleic acids: brightly fluorescent probes for detection of nucleic acids in cells // *J. Am. Chem. Soc.* - 2010. - V. 132. - N. 40. - P. 14221–14228.
104. Ostergaard M.E., Maity J., Babu B.R., Wengel J., Hrdlicka P.J. Novel insights into the use of Glowing LNA as nucleic acid detection probes – influence of labeling density and nucleobases // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2010. - V. 20. - N. 24. - P. 7265–7268.
105. Sau S.P., Madsen A.S., Podbevsek P., Andersen N.K., Kumar T.S., Andersen S., Rathje R.L., Anderson B.A., Guenther D.C., Karmakar S., Kumar P., Plavec J., Wengel J., Hrdlicka P.J. Identification and characterization of second-generation invader locked nucleic acids (LNAs) for mixed-sequence recognition of double-stranded DNA // *J. Org. Chem.* - 2013. - V. 78. - N. 19. - P. 9560–9570.
106. Kumar T.S., Wengel J., Hrdlicka P.J. 2'-N-(pyren-1-yl)acetyl-2'-amino-alpha-L-LNA: synthesis and detection of single nucleotide mismatches in DNA and RNA targets // *ChemBioChem.* - 2007. - V. 8. - N. 10. - P. 1122–1125.
107. Kumar P., Sharma P.K., Nielsen P. Synthesis, hybridization and fluorescence properties of a 2'-C-pyrene-triazole modified arabino-uridine nucleotide // *Bioorg. Med. Chem.* - 2017. - V. 25. - N. 7. - P. 2084–2090.

108. Smalley M.K., Silverman S.K. Fluorescence of covalently attached pyrene as a general RNA folding probe // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - V. 34. - N. 1. - P. 152–166.
109. Mahara A., Iwase R., Yamana K., Yamaoka T., Murakami A. Characterization of RNA structure by bis-pyrene-labeled 2'-O-methyloligonucleotides // *Nucleic Acids Symp Ser. (Oxf.)*-2000. - N. 44. - P. 199–200.
110. Sakamoto T., Kobori A., Shigezawa M., Amitani Y., Higuchi M., Murakami A. Homogeneous fluorescence assays for RNA diagnosis by pyrene-conjugated 2'-O-methyloligoribonucleotides // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2007. - V. 26. - N. 10-12. - P. 1659–1664.
111. Sakamoto T., Kobori A., Murakami A. Microarray-based label-free detection of RNA using bispyrene-modified 2'-O-methyl oligoribonucleotide as capture and detection probe // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2008. - V. 18. - N. 8. - P. 2590–2593.
112. Denn B., Karmakar S., Guenther D.C., Hrdlicka P.J. Sandwich assay for mixed-sequence recognition of double-stranded DNA: Invader-based detection of targets specific to foodborne pathogens // *Chem. Commun.* - 2013. - V. 49. - N. 84. - P. 9851–9853.
113. Didion B. A., Karmakar S., Guenther D.C., Sau S.P., Verstegen J.P., Hrdlicka P.J. Invaders: recognition of double-stranded DNA by using duplexes modified with interstrand zippers of 2'-O-(pyren-1-yl)methyl-ribonucleotides // *ChemBioChem.* - 2013. - V. 14. - N. 13. - P. 1534–1538.
114. Karmakar S., Madsen A.S., Guenther D.C., Gibbons B.C., Hrdlicka P.J. Recognition of double-stranded DNA using energetically activated duplexes with interstrand zippers of 1-, 2- or 4-pyrenyl-functionalized O2'-alkylated RNA monomers // *Org. Biomol. Chem.* - 2014. - V. 12. - N. 39. - P. 7758–7773.
115. Imincan G., Pei F., Yu L., Jin H., Zhang L., Yang X., Zhang L., Tang X. Microenvironmental effect of 2'-O-(1-pyrenylmethyl)uridine modified fluorescent oligonucleotide probes on sensitive and selective detection of target RNA // *Anal. Chem.* - 2016. - V. 88. - N. 8. - P. 4448–4455.
116. Cieslak J., Grajkowski A., Ausin C., Gapeev A., Beaucage S.L. Permanent or reversible conjugation of 2'-O- or 5'-O-aminooxymethylated nucleosides with functional groups as a convenient and efficient approach to the modification of RNA and DNA sequences // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - V. 40. - N. 5. - P. 2312–2329.
117. Hwang J.T., Baltasar F.E., Cole D.L., Sigman D.S., Chen C.H., Greenberg M.M. Transcription inhibition using modified pentanucleotides // *Bioorg. Med. Chem.* - 2003. - V. 11. - N. 10. - P. 2321–2328.
118. Manoharan M., Tivel K.L., Andrade L.K., Cook P.D. 2'-O- and 3'-O- pyrimidine aminotether-containing oligonucleotides: Synthesis and conjugation chemistry // *Tetrahedron Lett.* - 1995. - V. 36. - N. 21. - P. 3647–3650.
119. Anderson B. A., Onley J.J., Hrdlicka P.J. Recognition of double-stranded DNA using energetically activated duplexes modified with N2'-pyrene-, perylene-, or coronene-functionalized 2'- N -methyl-2'-amino-DNA monomers // *J. Org. Chem.* - 2015. - V. 80. - N. 11. - P. 5395–5406.
120. Anderson B. A., Hrdlicka P.J. Synthesis and characterization of oligodeoxyribonucleotides modified with 2'-thio-2'-deoxy-2'-S-(pyren-1-yl)methyluridine // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2015. - V. 25. - N. 18. - P. 3999–4004.
121. Anderson B. A., Hrdlicka P.J. Merging two strategies for mixed-sequence recognition of double-stranded DNA: pseudocomplementary Invader probes // *J. Org. Chem.* - 2016. - V. 81. - N. 8. - P. 3335–3346.

122. Silverman S.K., Deras M.L., Woodson S.A., Scaringe S.A., Cech T.R. Multiple folding pathways for the P4 - P6 RNA domain // *Biochemistry*. - 2000. - V. 39. - N. 40. - P. 12465–12475.
123. Astakhova I.K., Wengel J. Scaffolding along nucleic acid duplexes using 2'-amino-locked nucleic acids // *Acc. Chem. Res.* - 2014. - V. 47. - N. 6. - P. 1768–1777.
124. Kumar T.S., Myznikova A., Samokhina E., Astakhova I.K. Rapid genotyping using pyrene–perylene locked nucleic acid complexes // *Artif. DNA PNA XNA*. - 2013. - V. 4. - N. 2. - P. 58–68.
125. Hrdlicka P.J., Østergaard M.E. Fluorophore-functionalized Locked Nucleic Acids (LNAs) // *DNA Conjugates and Sensors, RSC Biomolecular Science Series* / ed. K. R. Brown and T. Brown. – RSC Publishing, 2012. - V. 26. – P. 1-33.
126. Andersen N.K., Anderson B.A., Wengel J., Hrdlicka P.J. Synthesis and characterization of oligodeoxyribonucleotides modified with 2'-amino- α -L-LNA adenine monomers: high-affinity targeting of single-stranded DNA // *J. Org. Chem.* - 2013. - V. 78. - N. 24. - P. 12690–12702.
127. Karlsen K.K., Pasternak A., Jensen T.B., Wengel J. Pyrene-modified unlocked nucleic acids: synthesis, thermodynamic studies, and fluorescent properties // *ChemBioChem*. - 2012. - V. 13. - N. 4. - P. 590–601.
128. Sau S.P., Hrdlicka P.J. C2'-pyrene-functionalized triazole-linked DNA: universal DNA/RNA hybridization probes // *J. Org. Chem.* - 2011. - V. 77. - N. 1. - P. 5–16.
129. Marti A.A., Li X., Jockusch S., Li Z., Raveendra B., Kalachikov S., Russo J.J., Morozova I., Puthanveetil S. V., Ju J., Turro N.J. Pyrene binary probes for unambiguous detection of mRNA using time-resolved fluorescence spectroscopy // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - V. 34. - N. 10. - P. 3161–3168.
130. Bichenkova E. V., Gbaj A., Walsh L., Savage H.E., Rogert C., Sardarian A.R., Etchells L.L., Douglas K.T. Detection of nucleic acids in situ: novel oligonucleotide analogues for target-assembled DNA-mounted exciplexes. // *Org. Biomol. Chem.* - 2007. - V. 5. - N. 7. - P. 1039–1051.
131. Kholodar S.A., Novopashina D.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G. Multipyrene tandem probes for point mutations detection in DNA // *J. Nucleic Acids*. - 2013. - V. 2013. - P. 860457.
132. Marti A.A., Li X., Jockusch S., Li Z., Raveendra B., Kalachikov S., Russo J.J., Morozova I., Puthanveetil S. V., Ju J., Turro N.J. Pyrene binary probes for unambiguous detection of mRNA using time-resolved fluorescence spectroscopy // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - V. 34. - N. 10. - P. 3161–3168.
133. Van Daele I., Bomholt N., Filichev V. V., Van Calenbergh S., Pedersen E.B. Triplex formation by pyrene-labelled probes for nucleic acid detection fluorescence assays // *ChemBioChem*. - 2008. - V. 9. - N. 5. - P. 791–801.
134. Ejlersen M., Langkjær N., Wengel J., Olsen C.E., Wengel J., Rapp A., Schmitt E., Janz S., Cremer C., Johns R., Severson G., Granger B., Charmley R., Houston M., Templin M. V., Polisky B. 3'-Pyrene-modified unlocked nucleic acids: synthesis, fluorescence properties and a surprising stabilization effect on duplexes and triplexes // *Org. Biomol. Chem.* - 2017. - V. 15. - N. 9. - P. 2073–2085.
135. Bryld T., Hojland T., Wengel J. DNA-selective hybridization and dual strand invasion of short double-stranded DNA using pyren-1-ylcarbonyl-functionalized 4'-C-piperazinomethyl-DNA // *Chem. Commun.* - 2004. - N. 9. - P. 1064–1065.

136. Yamana K., Nunota K., Nakano H., Sangen O. A new method for introduction of a pyrene group into a terminal position of an oligonucleotide // *Tetrahedron Lett.* - 1994. - V. 35. - N. 16. - P. 2555–2558.
137. Yamana K., Kumamoto S., Nakano H. Homopyrimidine Oligonucleotides Modified by a Pyrenylmethyl Group at the Terminal Position: Enhanced Fluorescence upon Binding to Double Helical DNA // *Chem. Lett.* - 1997. - V. 26. - N. 11. - P. 1173–1174.
138. Chen Y., Yang C.J., Wu Y., Conlon P., Kim Y., Lin H., Tan W. Light-switching excimer beacon assays for ribonuclease H kinetic study // *ChemBioChem.* - 2008. - V. 9. - N. 3. - P. 355–359.
139. Huang J., Wu Y., Chen Y., Zhu Z., Yang X., Yang C.J., Wang K., Tan W. Pyrene-excimer probes based on the hybridization chain reaction for the detection of nucleic acids in complex biological fluids // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2011. - V. 50. - N. 2. - P. 401–404.
140. Fujimoto K., Shimizu H., Inouye M. Unambiguous detection of target DNAs by excimer-monomer switching molecular beacons // *J. Org. Chem.* - 2004. - V. 69. - N. 10. - P. 3271–3275.
141. Nagatoishi S., Nojima T., Juskowiak B., Takenaka S. A pyrene-labeled G-quadruplex oligonucleotide as a fluorescent probe for potassium ion detection in biological applications // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2005. - V. 44. - N. 32. - P. 5067–5070.
142. Shi C., Gu H., Ma C. An aptamer-based fluorescent biosensor for potassium ion detection using a pyrene-labeled molecular beacon // *Anal. Biochem.* - 2010. - V. 400. - N. 1. - P. 99–102.
143. Yamana K., Iwai T., Ohtani Y., Sato S., Nakamura M., Nakano H. Bis-pyrene-labeled oligonucleotides: sequence specificity of excimer and monomer fluorescence changes upon hybridization with DNA // *Bioconjugate Chem.* - 2002. - V. 13. - N. 6. - P. 1266–1273.
144. Ohshita Y., Nakamura M., Maruyama A., Yamana K. New pyrene-excimer probe for detection of single base mismatches in DNA // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* - 2005. - N. 49. - P. 137–138.
145. Yamana K., Fukunaga Y., Ohtani Y., Sato S., Nakamura M., Kim W.J., Akaike T., Maruyama A. DNA mismatch detection using a pyrene-excimer-forming probe // *Chem. Commun.* - 2005. - N. 19. - P. 2509–2511.
146. Yamana K., Ohshita Y., Fukunaga Y., Nakamura M., Maruyama A. Bis-pyrene-labeled molecular beacon: A monomer-excimer switching probe for the detection of DNA base alteration // *Bioorg. Med. Chem.* - 2008. - V. 16. - N. 1. - P. 78–83.
147. Балакин К.В., Коршун В.А., Прохоренко И.А., Малеев Г.В., Куделина И.А., Гонтарев С.В., Берлин Ю.А. Новый реагент для мечения биомолекул – активированное производное пиренового бихромофора с эксимерной флуоресценцией // *Биоорган. химия.* - 1997. - V. 23. - N. 1. - P. 33–41.
148. Lewis F.D., Zhang Y., Letsinger R.L. Bispyrenyl excimer fluorescence: A sensitive oligonucleotide probe // *J. Am. Chem. Soc.* - 1997. - V. 119. - N. 23. - P. 5451–5452.
149. Saito Y., Mizuno E., Bag S.S., Suzuka I., Saito I. Design of a novel G-quenched molecular beacon: a simple and efficient strategy for DNA sequence analysis // *Chem. Commun.* - 2007. - N. 43. - P. 4492–4494.
150. Bichenkova E. V, Savage H.E., Sardarian A.R., Douglas K.T. Target-assembled tandem oligonucleotide systems based on exciplexes for detecting DNA mismatches and single nucleotide polymorphisms // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2005. - V. 332. - N. 4. - P. 956–964.

151. Bichenkova E. V, Sardarian A.R., Wilton A.N., Bonnet P., Bryce R., Douglas K.T. Exciplex fluorescence emission from simple organic intramolecular constructs in non-polar and highly polar media as model systems for DNA-assembled exciplex detectors // *Org. Biomol. Chem.* - 2006. - V. 4. - N. 2. - P. 367–378.
152. Kostenko E., Dobrikov M., Komarova N., Pyshniy D., Vlassov V., Zenkova M. 5'-Bis-pyrenylated oligonucleotides display enhanced excimer fluorescence upon hybridization with DNA and RNA // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - V. 20. - N. 10-11. - P. 1859–1870.
153. Kholodar S.A., Novopashina D.S., Meschaninova M.I., Lomzov A.A., Venyaminova A.G. Multipyrene tandem probes for detection of C677T polymorphism in MTHFR gene // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*. - 2009. - N. 53. - P. 143–144.
154. Novopashina D.S., Meschaninova M.I., Kholodar S.A., Lomzov A.A., Venyaminova A.G. New excimer-based tandem systems for SNP detection // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*. - 2008. - N. 52. - P. 229–230.
155. Новопашина Д.С., Тоцкая О.С., Холодарь С.А., Мещанинова М.И., Веньямина А.Г. Олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) и их производные. III. 5'-Моно- и 5'-биспиренильные производные олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и их 3'-модифицированных аналогов. Синтез и свойства // *Биоорг. химия.* - 2008. - V. 34. - N. 5. - P. 671–682.
156. Aparin I.O., Farzan V.M., Veselova O., Chistov A., Podkolzin A.T., Ustinov A. V, Shipulin G., Formanovsky A., Korshun V., Zatsepin T.S. 1-Phenylethynylpyrene (PEPy) as a novel blue-emitting dye for qPCR assay // *Analyst.* - 2016. - V. 141. - N. 4. - P. 1331–1338.
157. Conlon P., Yang C.J., Wu Y., Chen Y., Martinez K., Kim Y., Stevens N., Marti A. A., Jockusch S., Turro N.J., Tan W. Pyrene excimer signaling molecular beacons for probing nucleic acids // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - N. 1. - P. 336–342.
158. Ebata K., Masuko M., Ohtani H., Kashiwasake-Jibu M. Nucleic acid hybridization accompanied with excimer formation from two pyrene-labeled probes // *Photochem. photobiol.* - 1995. - V. 62. - N. 5. - P. 836–839.
159. Østergaard M.E., Wamberg M.C., Pedersen E.B. Pyrene intercalating nucleic acids with a carbon linker // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2011. - V. 30. - N. 3. - P. 210–226.
160. Bittermann H., Siegemund D., Malinovskii V.L., Häner R. Dialkynylpyrenes: strongly fluorescent, environment-sensitive DNA building blocks // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - V. 130. - N. 46. - P. 15285–15287.
161. Häner R., Biner S.M., Langenegger S.M., Meng T., Malinovskii V.L. A highly sensitive, excimer-controlled molecular beacon // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2010. - V. 49. - N. 7. - P. 1227–1230.
162. Malakhov A.D., Skorobogaty M.V., Prokhorenko I.A., Gontarev S.V., Kozhich D.T., Stetsenko D.A., Stepanova I.A., Shenkarev Z.O., Berlin Y.A., Korshun V.A. 1-(Phenylethynyl)pyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, useful fluorescent dyes for DNA labeling: excimer formation and energy transfer // *Eur. J. Org. Chem.* - 2004. - V. 2004. - N. 6. - P. 1298–1307.
163. Prokhorenko I. A., Malakhov A.D., Kozlova A. A., Momynaliev K., Govorun V.M., Korshun V. A. Phenylethynylpyrene-labeled oligonucleotide probes for excimer fluorescence SNP analysis of 23S rRNA gene in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains // *Mutat. Res.* - 2006. - V. 599. - N. 1-2. - P. 144–151.
164. Filichev V. V., Pedersen E.B. Stable and selective formation of Hoogsteen-type triplexes and duplexes using Twisted Intercalating Nucleic Acids (TINA) prepared via postsynthetic Sonogashira solid-phase coupling reactions // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005. - V. 127. - P. 14849–14858.

165. Filichev V. V., Nielsen M.C., Bomholt N., Jessen C.H., Pedersen E.B. High thermal stability of 5'-5'-linked alternate Hoogsteen triplexes at physiological pH // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2006. - V. 45. - N. 32. - P. 5311–5315.
166. Paramasivam M., Cogoi S., Filichev V. V., Bomholt N., Pedersen E.B., Xodo L.E. Purine Twisted-Intercalating Nucleic Acids: A new class of anti-gene molecules resistant to potassium-induced aggregation // *Nucleic Acids Res.* - 2008. - V. 36. - N. 10. - P. 3494–3507.
167. Bomholt N., Osman A.M.A., Pedersen E.B. High physiological thermal triplex stability optimization of Twisted Intercalating Nucleic Acids (TINA) // *Org. Biomol. Chem.* - 2008. - V. 6. - N. 20. - P. 3714.
168. Yang H., Seela F. “Bis-Click” Ligation of DNA: template-controlled assembly, circularisation and functionalisation with bifunctional and trifunctional azides // *Chem. Eur. J.* - 2017. - V. 23. - N. 14. - P. 3375–3385.
169. Asanuma H., Fujii T., Kato T., Kashida H. Coherent interactions of dyes assembled on DNA // *J. Photochem. Photobiol. C* - 2012. - V. 13. - N. 2. - P. 124–135.
170. Kashida H., Sekiguchi K., Higashiyama N., Kato T., Asanuma H., Murakami A., Jaeger W., Letsinger R.L. Cyclohexyl “base pairs” stabilize duplexes and intensify pyrene fluorescence by shielding it from natural base pairs // *Org. Biomol. Chem.* - 2011. - V. 9. - N. 24. - P. 8313.
171. Kashida H., Takatsu T., Sekiguchi K., Asanuma H. An efficient fluorescence resonance energy transfer (FRET) between pyrene and perylene assembled in a DNA duplex and its potential for discriminating single-base changes // *Chem. Eur. J.* - 2010. - V. 16. - N. 8. - P. 2479–2486.
172. Kashida H., Asanuma H., Komiyama M. Insertion of two pyrene moieties into oligodeoxyribonucleotides for the efficient detection of deletion polymorphisms // *Chem. Commun.* - 2006. - N. 26. - P. 2768–2770.
173. Kashida H., Komiyama M., Asanuma H. Exciplex formation between pyrene and *N,N*-dimethylaniline in DNA for the detection of one-base deletion // *Chem. Lett.* - 2006. - V. 35. - N. 8. - P. 934–935.
174. Asanuma H., Hayashi H., Zhao J., Liang X., Yamazawa A., Kuramochi T., Matsunaga D., Aiba Y., Kashida H., Komiyama M. Enhancement of RNA cleavage activity of 10-23 DNase by covalently introduced intercalator // *Chem. Commun.* - 2006. - V. 5. - N. 48. - P. 5062–5064.
175. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Korshun V.A., Gait M.J. (R)-2,4-Dihydroxybutyramide seco-pseudonucleosides: new versatile homochiral synthons for synthesis of modified oligonucleotides // *Org. Lett.* - 2002. - V. 4. - N. 26. - P. 4607–4610.
176. Trkulja I., Häner R. Triple-helix mediated excimer and exciplex formation // *Bioconjugate Chem.* - 2007. - V. 18. - N. 2. - P. 289–292.
177. Samain F., Malinovskii V.L., Langenegger S.M., Häner R. Spectroscopic properties of pyrene-containing DNA mimics // *Bioorg. Med. Chem.* - 2008. - V. 16. - N. 1. - P. 27–33.
178. Looser V., Langenegger S.M., Häner R., Hartig J.S. Pyrene modification leads to increased catalytic activity in minimal hammerhead ribozymes // *Chem. Commun.* - 2007. - N. 42. - P. 4357–4359.
179. Langenegger S.M., Häner R. Excimer formation by interstrand stacked pyrenes // *Chem. Commun.* - 2004. - N. 24. - P. 2792–2793.
180. Malinovskii V.L., Samain F., Haner R. Helical arrangement of interstrand stacked pyrenes in a DNA framework // *Angew. Chem., Int. Ed.* - 2007. - V. 46. - N. 24. - P. 4464–4467.

181. Filichev V. V., Pedersen E.B. Intercalating nucleic acids (INAs) with insertion of N-(pyren-1-ylmethyl)-(3R,4R)-4-(hydroxymethyl)pyrrolidin-3-ol. DNA (RNA) duplex and DNA three-way junction stabilities // *Org. Biomol. Chem.* - 2003. - V. 1. - N. 1. - P. 100–103.
182. Kupryushkin M.S., Nekrasov M.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D. V. Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral nonnucleosidic monomers // *Org. Lett.* - 2014. - V. 16. - N. 11. - P. 2842–2845.
183. Prokhorenko I.A., Astakhova I. V., Momynaliev K.T., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Phenylethynylpyrene excimer forming hybridization probes for fluorescence SNP detection // *Meth. Mol. Biol.* - 2009. - V. 578. - P. 209–222.
184. Vyborna Y., Vybornyi M., Rudnev A. V., Häner R. DNA-grafted supramolecular polymers: helical ribbon structures formed by self-assembly of Pyrene-DNA chimeric oligomers // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2015. - V. 54. - N. 27. - P. 7934–7938.
185. Vyborna Y., Vybornyi M., Häner R. From Ribbons to Networks: hierarchical organization of DNA-grafted supramolecular polymers // *J. Am. Chem. Soc.* - 2015. - V. 137. - N. 44. - P. 14051–14054.
186. Vyborna Y., Vybornyi M., Haner R. Pathway diversity in the self-assembly of DNA-derived bioconjugates // *Bioconjugate Chem.* - 2016. - V. 27. - N. 11. - P. 2755–2761.
187. Wilson J.N., Kool E.T. Fluorescent DNA base replacements: Reporters and sensors for biological systems // *Org. Biomol. Chem.* - 2006. - V. 4. - N. 23. - P. 4265–4274.
188. Hrdlicka P.J., Babu B.R., Sorensen M.D., Harrit N., Wengel J., Sørensen M.D. Multilabeled pyrene-functionalized 2'-amino-LNA probes for nucleic acid detection in homogeneous fluorescence assays // *J. Am. Chem. Soc.* - 2005. - V. 127. - N. 38. - P. 13293–13299.
189. Umemoto T., Hrdlicka P.J., Babu B.R., Wengel J. Sensitive SNP dual-probe assays based on pyrene-functionalized 2'-amino-LNA: lessons to be learned // *ChemBioChem.* - 2007. - V. 8. - N. 18. - P. 2240–2248.
190. Karlsen K.K., Okholm A., Kjems J., Wengel J. A quencher-free molecular beacon design based on pyrene excimer fluorescence using pyrene-labeled UNA (unlocked nucleic acid) // *Bioorg. Med. Chem.* - 2013. - V. 21. - N. 20. - P. 6186–6190.
191. Varghese R., Wagenknecht H.-A., Fujiwara Y., Mårtensson J., Brown T., Wilhelmsson L.M., Albinsson B., Akins D.L., Puthanveetil S. V., Ju J., Turro N.J. Red–white–blue emission switching molecular beacons: ratiometric multicolour DNA hybridization probes // *Org. Biomol. Chem.* - 2010. - V. 8. - N. 3. - P. 526–528.
192. Silverman S.K., Cech T.R. RNA tertiary folding monitored by fluorescence of covalently attached pyrene // *Biochemistry.* - 1999. - V. 38. - N. 43. - P. 14224–14237.
193. Silverman S.K., Cech T.R. An early transition state for folding of the P4-P6 RNA domain // *RNA.* - 2001. - V. 7. - N. 2. - P. 161–166.
194. Jeong H.S., Kang S., Lee J.Y., Kim B.H. Probing specific RNA bulge conformations by modified fluorescent nucleosides // *Org. Biomol. Chem.* - 2009. - V. 7. - N. 5. - P. 921–925.
195. Pasternak A., Kierzek E., Pasternak K., Fratzek A., Turner D.H., Kierzek R. The thermodynamics of 3'-terminal pyrene and guanosine for the design of isoenergetic 2'-O-methyl-RNA-LNA chimeric oligonucleotide probes of RNA structure // *Biochemistry.* - 2008. - V. 47. - N. 5. - P. 1249–1258.
196. Okamoto A., Ochi Y., Saito I. Fluorometric sensing of the salt-induced B–Z DNA transition by combination of two pyrene-labeled nucleobases // *Chem. Commun.* - 2005. - N. 9. - P. 1128–1130.

197. Zhu H., Lewis F.D. Pyrene excimer fluorescence as a probe for parallel G-quadruplex formation // *Bioconjugate Chem.* - 2007. - V. 18. - N. 4. - P. 1213–1217.
198. Cupane A., Dembska A., Pedzinski T., Takenaka S., Juskowiak B. Emission lifetime study of fluorescence probes based on G-quadruplex oligonucleotides end-labeled with pyrene moieties // *J. Spectrosc.* - V. 24. - N. 3-4. - P. 325–331.
199. Seo Y.J., Lee I.J., Yi J.W., Kim B.H., Netzel T.L., Jang S.K., Kim B.H., Helene C., Mergny J.-L. Probing the stable G-quadruplex transition using quencher-free end-stacking ethynyl pyrene-adenosine // *Chem. Commun.* - 2007. - V. 117. - N. 27. - P. 2817–2819.
200. Umemoto T., Hrdlicka P.J., Babu B.R., Wengel J. Dual-probe system using pyrenylmethyl-modified amino-LNA for mismatch detection // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2007. - V. 26. - N. 10-12. - P. 1261–1263.
201. Okamoto A., Tainaka K., Ochi Y., Kanatani K., Saito I., Saito I., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E.L., Neri B.P., Lyamichev V.I. Simple SNP typing assay using a base-discriminating fluorescent probe // *Mol. Biosyst.* - 2006. - V. 2. - N. 2. - P. 122-127.
202. Ostergaard M.E., Kumar P., Baral B., Guenther D.C., Anderson B.A., Ytreberg F.M., Deobald L., Paszczyński A.J., Sharma P.K., Hrdlicka P.J. C5-Functionalized DNA, LNA, and alpha-L-LNA: positional control of polarity-sensitive fluorophores leads to improved SNP-typing // *Chem. Eur. J.* - 2011. - V. 17. - N. 11. - P. 3157–3165.
203. Kaura M., Kumar P., Hrdlicka P.J. Synthesis, hybridization characteristics, and fluorescence properties of oligonucleotides modified with nucleobase-functionalized locked nucleic acid adenosine and cytidine monomers // *J. Org. Chem.* - 2014. - V. 79. - N. 13. - P. 6256–6268.
204. Karmakar S., Hrdlicka P.J. DNA strands with alternating incorporations of LNA and 2'-O-(pyren-1-yl)methyluridine: SNP-discriminating RNA detection probes // *Chem. Sci.* - 2013. - V. 4. - N. 9. - P. 3447–3454.
205. Boutorine A.S., Doluca O., Filichev V. V. Optimization of the sequence of twisted intercalating nucleic acids (TINA) forming triple helix with the polypurine tract of the proviral HIV DNA // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)*. - 2009. - N. 53. - P. 139–140.
206. Géci I., Filichev V. V., Pedersen E.B. Synthesis of Twisted Intercalating Nucleic Acids possessing acridine derivatives. Thermal stability studies // *Bioconjugate Chem.* - 2006. - V. 17. - N. 4. - P. 950–957.
207. Doluca O., Boutorine A.S., Filichev V. V. Triplex-forming twisted intercalating nucleic acids (TINAs): design rules, stabilization of antiparallel DNA triplexes and inhibition of G-quartet-dependent self-association // *ChemBioChem.* - 2011. - V. 12. - N. 15. - P. 2365–2374.
208. Filichev V.V., Astakhova I.V., Malakhov A.D., Korshun V.A., Pedersen E.B. 1-, 2-, and 4-ethynylpyrenes in the structure of Twisted Intercalating Nucleic Acids: Structure, thermal stability, and fluorescence relationship // *Chem. - A Eur. J.* - 2008. - V. 14. - N. 32. - P. 9968–9980.
209. Géci I., Filichev V.V., Pedersen E.B. Stabilization of Parallel Triplexes by Twisted Intercalating Nucleic Acids (TINAs) Incorporating 1,2,3-Triazole Units and Prepared by Microwave-Accelerated Click Chemistry // *Chem. - A Eur. J.* - 2007. - V. 13. - N. 22. - P. 6379–6386.
210. Sau S.P., Kumar T.S., Hrdlicka P.J. Invader LNA: efficient targeting of short double stranded DNA // *Org. Biomol. Chem.* - 2010. - V. 8. - N. 9. - P. 2028–2036.
211. Guenther D.C., Anderson G.H., Karmakar S., Anderson B. a., Didion B. a., Guo W., Verstegen J.P., Hrdlicka P.J. Invader probes: harnessing the energy of intercalation to facilitate recognition

- of chromosomal DNA for diagnostic applications // *Chem. Sci.* - 2015. - V. 6. - N. 8. - P. 5006–5015.
212. Boutorine A.S., Novopashina D.S., Krasheninina O.A., Nozeret K., Venyaminova A.G. Fluorescent probes for nucleic Acid visualization in fixed and live cells // *Molecules.* - 2013. - V. 18. - N. 12. - P. 15357–15397.
213. Guo J., Ju J., Turro N.J. Fluorescent hybridization probes for nucleic acid detection // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2012. - V. 402. - N. 10. - P. 3115–3125.
214. Armitage B.A. Imaging of RNA in live cells // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2011. - V. 15. - N. 6. - P. 806–812.
215. Kolpashchikov D.M. Binary probes for nucleic acid analysis // *Chem. Rev.* - 2010. - V. 110. - N. 8. - P. 4709–4723.
216. Moriguchi T., Ichimura M., Kato M., Suzuki K., Takahashi Y., Shinozuka K. Development of the excimer probe responsible for DNA target bearing the silylated pyrenes at base moiety // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2014. - V. 24. - P. 4372–4375.
217. Wang X., Hudson R.H. PNA molecular beacons assembled by post-synthetic click chemistry functionalization // *ChemBioChem.* - 2015. - V. 16. - N. 15. - P. 2156–2161.
218. Astakhova I.K., Kumar T.S., Campbell M.A., Ustinov A.V., Korshun V.A., Wengel J. Branched DNA nanostructures efficiently stabilised and monitored by novel pyrene–perylene 2'- α -L-amino-LNA FRET pairs // *Chem. Commun.* - 2013. - V. 49. - P. 511–513.
219. Molenaar C., Marras S.A., Slats J.C., Truffert J.C., Lemaitre M., Raap A.K., Dirks R.W., Tanke H.J. Linear 2' O-Methyl RNA probes for the visualization of RNA in living cells // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - V. 29. - N. 17. - P. e89.
220. Kostenko E. V., Beabealashvilly R.S., Vlassov V. V., Zenkova M.A. Secondary structure of the 5'-region of PGY1/MDR1 mRNA // *FEBS Lett.* - 2000. - V. 475. - N. 3. - P. 181–186.
221. Robert J., Jarry C. Multidrug resistance reversal agents // *J. Med. Chem.* - 2003. - V. 46. - N. 23. - P. 4805–4817.
222. Novopashina D.S., Totskaya O.S., Meschaninova M.I., Stetsenko D.A., Venyaminova A.G. Novel method for the synthesis of 2' -phosphorylated oligonucleotides // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2007. - V. 26. - N. 6-7. - P. 821–825.
223. Novopashina D.S., Totskaya O.S., Lomzov A.A., Venyaminova A.G. 3'-Modified oligo (2'-O-methylribonucleotides) as improved probes for hybridization with RNA // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* - 2005. - V. 24. - N. 5-7. - P. 527–531.
224. Ortigão J.F., Rösch H., Selter H., Fröhlich A., Lorenz A., Montenarh M., Seliger H. Antisense effect of oligodeoxynucleotides with inverted terminal internucleotidic linkages: a minimal modification protecting against nucleolytic degradation // *Antisense Res. Dev.* - 1992. - V. 2. - N. 2. - P. 129–146.
225. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Ревердатто С.В., Чахлаева О.Г. Применение N-метилимидазольного фосфотриэфирного метода для получения олигонуклеотидов, полезных при изучении рекомбинантных ДНК // *Биоорган. химия.* - 1983. - V. 9. - N. 10. - P. 1367–1381.
226. Kierzek R. The stability of trisubstituted internucleotide bond in the presence of vicinal 2'-hydroxyl. Chemical synthesis of uridylyl(2'-phosphate)-(3'→5')-uridine // *Nucleosides Nucleotides.* - 1994. - V. 13. - N. 8. - P. 1757–1768.
227. Sekine M., Tsuruoka H., Iimura S., Kusuoku H., Wada T., Furusawa K. Studies on steric and electronic control of 2'-3' phosphoryl migration in 2'-phosphorylated uridine derivatives and its

- application to the synthesis of 2'-phosphorylated oligouridylates // *J. Org. Chem.* - 1996. - V. 61. - N. 12. - P. 4087–4100.
228. Wincott F., DiRenzo A., Shaffer C., Grimm S., Tracz D., Workman C., Sweedler D., Gonzalez C., Scaringe S., Usman N. Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes // *Nucleic Acids Res.* - 1995. - V. 23. - N. 14. - P. 2677–2684.
229. Novopashina D.S., Totskaya O.S., Kholodar' S.A., Meshchaninova M. I., Ven'yaminova A.G. Oligo(2'-O-methylribonucleotides) and Their Derivatives: III. 5'-Mono- and 5'-bispyrenyl derivatives of oligo(2'-O-methylribonucleotides) and their 3'-modified analogues: synthesis and properties // *Russ. J. Bioorg. Chem.* - 2008. - V. 34. - N. 5. - P. 602–612.
230. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. Сенсibilizированная фотомодификация ДНК бинарными системами. I. Синтез олигонуклеотидных реагентов, влияние их строения на эффективность модификации мишени // *Биоорган. химия.* - 1997. - V. 23. - N. 3. - P. 191–199.
231. Pyshnyi D. V, Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Ivanova E.M. Hybridization of the bridged oligonucleotides with DNA: thermodynamic and kinetic studies // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2006. - V. 23. - N. 5. - P. 567–580.
232. Petersheim M., Turner D.H. Base-stacking and base-pairing contributions to helix stability: thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp // *Biochemistry.* - 1983. - V. 22. - N. 2. - P. 256–263.
233. Kierzek E., Mathews D.H., Ciesielska A., Turner D.H., Kierzek R. Nearest neighbor parameters for Watson-Crick complementary heteroduplexes formed between 2'-O-methyl RNA and RNA oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - V. 34. - N. 13. - P. 3609–3614.
234. Eder P.S., DeVine R.J., Dagle J.M., Walder J.A. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3'-exonuclease in plasma // *Antisense Res. Dev.* - 1991. - V. 1. - N. 2. - P. 141–151.
235. Principles of fluorescence spectroscopy/ J. R. Lakowicz. - 3rd Ed. – Springer, 2006. - 954 p.
236. Экспериандова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк А.Т. Еще раз о пределах обнаружения и определения // *Журнал аналитической химии.* - 2010. - V. 65. - N. 3. - P. 229–234.
237. Wickstrom E. DNA and RNA derivatives to optimize distribution and delivery. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2015. - V. 87. - P. 25–34.
238. Pyshnyi D. V, Pyshnaya I., Levina A., Goldberg E., Zarytova V., Knorre D., Ivanova E. Thermodynamic analysis of stacking hybridization of oligonucleotides with DNA template // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2001. - V. 19. - N. 3. - P. 555–570.
239. Case D.A., Cheatham T.E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. The Amber biomolecular simulation programs // *J. Comput. Chem.* - 2005. - V. 26. - N. 16. - P. 1668–1688.
240. Connolly M.L. Analytical molecular surface calculation // *J. Appl. Crystallogr.* - 1983. - V. 16. - N. 5. - P. 548–558.
241. Zheng J., Yang R., Shi M., Wu C., Fang X., Li Y., Li J., Tan W. Rationally designed molecular beacons for bioanalytical and biomedical applications // *Chem. Soc. Rev.* - 2015. - V. 44. - N. 10. - P. 3036–3055.
242. Kolpashchikov D.M. An elegant biosensor molecular beacon probe: challenges and recent solutions // *Scientifica (Cairo).* - 2012. - V. 2012. - P. 928783.

243. Huang K., Marti A.A. Recent trends in molecular beacon design and applications // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2012. - V. 402. - N. 10. - P. 3091–3102.
244. Li Y., Zhou X., Ye D. Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2008. - V. 373. - N. 4. - P. 457–461.
245. Tan W., Wang K., Drake T.J. Molecular beacons // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2004. - V. 8. - N. 5. - P. 547–553.
246. Tsourkas A., Behlke M.A., Bao G. Hybridization of 2'-O-methyl and 2'-deoxy molecular beacons to RNA and DNA targets // *Nucleic Acids Res.* - 2002. - V. 30. - N. 23. - P. 5168–5174.
247. Ilieva M., Della Vedova P., Hansen O., Dufva M. Tracking neuronal marker expression inside living differentiating cells using molecular beacons // *Front. Cell. Neurosci.* - 2013. - V. 7. - P. 266.
248. Baker M.B., Bao G., Searles C.D. The use of molecular beacons to detect and quantify microRNA // *Methods Mol. Biol.* - 2013. - V. 1039. - P. 279–287.
249. Chen J., Lovell J.F., Lo P.-C., Stefflova K., Niedre M., Wilson B.C., Zheng G. A tumor mRNA-triggered photodynamic molecular beacon based on oligonucleotide hairpin control of singlet oxygen production // *Photochem. Photobiol. Sci.* - 2008. - V. 7. - N. 7. - P. 775–781.
250. Спутник химика/ Гордон А., Форд Р. – М.:Мир, 1984. – 543 с.
251. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование/ Маниатис Т., Фрич, Э., Сэмбрук Д. – М.: Мир, 1984. – 132 с.
252. Borer P.N. Handbook of biochemistry and molecular biology / G.D. Fasman - 3rd Edn. – Cleveland: CRC Press, 1975. - p.589-595
253. Milligan J.F., Groebe D.R., Witherell G.W., Uhlenbeck O.C. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates // *Nucleic Acids Res.* - 1987. - V. 15. - N. 21. - P. 8783–8798.
254. Shevelev G.Y., Krumkacheva O.A., Lomzov A.A., Kuzhelev A.A., Trukhin D. V., Rogozhnikova O.Y., Tormyshev V.M., Pyshnyi D. V., Fedin M. V., Bagryanskaya E.G. Triarylmethyl labels: toward improving the accuracy of epr nanoscale distance measurements in DNAs // *J. Phys. Chem. B.* - 2015. - V. 119. – N.43. - P. 13641-13648.