

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

## Том 47, номер 2, 2021

Статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в журнале “Russian Journal of Bioorganic Chemistry” ISSN 1068-1620, ©Pleiades Publishing, Ltd.

---

---

Модифицированные олигонуклеотиды: новые структуры, новые свойства, новые области применения

*В. Г. Метелев, Т. С. Орецкая* 179

Получение новых представителей класса фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов

*С. А. Жуков, Д. В. Пышный, М. С. Курдюшкин* 184

Взаимодействие липофильных конъюгатов модифицированных siРНК с гемопоэтическими клетками *in vitro* и *in vivo*

*И. В. Черников, М. И. Мещанинова, Д. В. Гладких, А. Г. Веньямина, М. А. Зенкова, В. В. Власов, Е. Л. Черноловская* 195

Противовирусная активность наноконплексов антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на белок VP72, в клетках Vero, инфицированных вирусом африканской чумы свиней

*А. В. Акобян, Е. А. Буракова, Э. А. Арабян, А. А. Фокина, А. Р. Коцинян, С. В. Васильева, О. С. Закарян, Д. А. Стеценко* 208

Новые двухкомпонентные пиренильные зонды на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции микроРНК

*О. А. Семиколенова, В. М. Гольшев, Б. Х. Ким, А. Г. Веньямина, Д. С. Новопашина* 218

Дизайн и валидация малых интерферирующих РНК для подавления экспрессии ганкирина в печени мыши

*Т. А. Приказчикова, Т. О. Абакумова, О. В. Сергеева, Т. С. Зацепин* 228

ДНК с 2-пиридилдитиогруппой при С2'-атоме – перспективные инструменты для фиксации белка MutS с сохранением его функциональной активности

*С. А. Перри, Е. А. Кубарева, М. В. Монахова, Р. М. Трикин, Е. М. Косарецкий, Е. А. Романова, В. Г. Метелев, П. Фридохфф, Т. С. Орецкая* 235

Сравнительное исследование гибридизационных свойств фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с ДНК и РНК

*А. А. Ломзов, М. С. Курдюшкин, Е. С. Дюдеева, Д. В. Пышный* 250

Направляющие РНКазу Р конъюгаты олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) как перспективные антибактериальные препараты

*Н. А. Данилин, А. Л. Матвеев, Н. В. Тикунова, А. Г. Веньямина, Д. С. Новопашина* 259

Детекция малых pРНК – продуктов транскрипции 6S РНК – с помощью нозерн-блот-гибридизации в “зеркальном” варианте

*О. Ю. Буренина, Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева* 270

Фотоактивируемая система CRISPR/Cas9

*Е. А. Ахметова, В. М. Гольшев, И. П. Вохтанцев, М. И. Мещанинова, А. Г. Веньямина, Д. С. Новопашина* 276

Проблемы синтеза олигонуклеотидных производных при реализации анхимерного эффекта

*Е. С. Дюдеева, А. С. Павлова, М. С. Курдюшкин, Д. В. Пышный, И. А. Пышная* 287

---

---





УДК 577.113.4:577.113.6

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ: НОВЫЕ СТРУКТУРЫ, НОВЫЕ СВОЙСТВА, НОВЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2021 г. В. Г. Метелев\*, Т. С. Орецкая\*<sup>#,</sup>

\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет и НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 28.09.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята к публикации 12.10.2020 г.

Нуклеиновые кислоты прошли длинный и тернистый путь “от лабораторного стола до больничной палаты” (“from bench to bedside”). В настоящее время можно предположить, что лекарственные препараты на основе модифицированных олигонуклеотидов найдут достойное применение в персонализированной медицине будущего.

*Ключевые слова:* модифицированные нуклеиновые кислоты, олигонуклеотидные медицинские препараты, антисмысловые олигонуклеотиды

DOI: 10.31857/S0132342321020172

Модифицированные олиго- и полинуклеотиды стали важнейшими инструментами в молекулярной биологии, биохимии, медицинской химии, диагностических процедурах и завоевывают свою нишу среди терапевтических средств нового поколения. Решающее значение для качественного скачка в изучении свойств и использовании такого рода соединений сыграло появление универсального автоматизированного метода синтеза фрагментов нуклеиновых кислот (НК). Конструирование, синтез и применение олигонуклеотидов как лекарственных препаратов были бы невозможны, если бы в апреле 1953 г. в журнале “Nature” не появились три легендарные статьи, описывающие структуру ДНК. Первая – Джеймса Уотсона (J.D. Watson) и Фрэнсиса Крика (F.H. Crick) [1], в которой впервые приведена трехмерная модель структуры ДНК. Две другие статьи были написаны учеными Королевского колледжа в Кембридже. Розалинд Франклин (R.E. Franklin) и Раймонд Гослинг (R.G. Gosling) представили исследование дифракции рентгеновских лучей на кристаллах ДНК [2], а Морис Уилкинс (M.H. Wilkins), Александр Стокс (A.R. Stokes) и Герберт Уилсон (H.R. Wilson) [3] сделали расчеты параметров двойной спирали на основе кристаллографических данных. История открытия двойной спирали хорошо описана не только в знаменитой книге Уотсона “Двойная спираль: воспоминания об открытии структуры ДНК” [4], но и в ряде других книг, например, в книге “Розалинд Франклин: темная

леди ДНК”, опубликованной Брендой Мэддокс (B. Maddox) в 2002 г. [5].

Появление этих книг, современных обзоров по истории развития химии нуклеиновых кислот и их применения [6–8], а также желание многих ученых представить свои работы в данном тематическом номере журнала свидетельствуют о том, что до сих пор значимость этого фантастического и феерического события, поистине величайшего в XX веке, и его последствий не перестает привлекать внимание ученых и историков науки.

История химического синтеза ДНК началась через два года после открытия структуры двойной спирали ДНК Уотсоном и Криком. Решение проблемы быстрого и эффективного синтеза фрагментов НК являлось основанием для развития молекулярной биологии, биотехнологии, генетики, инженерии белков, расшифровки генома человека. История синтеза НК включает тысячи работ ученых из многих стран мира. Исследования одних строились на достижениях других. Невозможно перечислить всех, кто внес свой вклад в развитие этой области. В первой классической работе, опубликованной А.М. Микельсоном (A.M. Michelson) и А.Р. Тоддом (A.R. Todd), описывался синтез динуклеотида с использованием соединений трехвалентного фосфора [9]. Это был “мастер-класс” постановки защитных групп и методов фосфитилирования. Впервые был использован прогрессивный для того времени способ выделения полученного динуклеозидфосфата с помощью бумажной ионообменной хроматографии. Знаменательными событиями в истории химии олигонуклеотидов явились синтез гена tРНК и появление универсального автоматизированного метода синтеза олигонуклеотидов, поэтому, при-

Сокращения: siРНК – малая интерферирующая РНК; АСО – антисмысловые олигонуклеотиды; НК – нуклеиновая кислота.

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (916) 206-41-02; факс: +7 (495) 939-31-81; эл. почта: oretskaya@belozersky.msu.ru).

зная заслуги многих химиков, в первую очередь следует отметить огромный вклад Х.Г. Кораны (H.G. Khorana) и М.Х. Карузерса (M.H. Caruthers) [6–8, 10–12]. Параллельно с совершенствованием методов создания межнуклеотидной связи и введения/удаления защитных групп начался бум по встраиванию модифицированных звеньев во фрагменты ДНК, изучению влияния модификаций на химические и физико-химические свойства одно- и двутяжевых фрагментов и их широкому использованию в фундаментальных исследованиях, медицинской и диагностической практике.

Немодифицированные НК могут выступать как объект и инструмент исследования или воздействия на биологические процессы. Однако введение модифицированных фрагментов в олигонуклеотидную цепь позволяет значительно расширить комплекс задач, в том числе существенно улучшить проникновение фрагментов ДНК через клеточные мембраны, повысить устойчивость к действию клеточных нуклеаз, увеличить термодинамическую стабильность НК-дуплексов. Встраивание в олигонуклеотид химически активных групп дает возможность получить разнообразные конъюгаты с молекулами пептидов, красителей и др. В принципе, возможно постсинтетическое введение статистических модификаций или модификаций по 3'- и/или 5'-концу олигонуклеотидов, однако наиболее универсальным методом является направленное встраивание модифицированного звена в заранее заданное положение олигомерной цепи в процессе химического синтеза. Модификации можно подразделить на терминальные и внутрицепочечные. Замена или введение дополнительных группировок может происходить по межнуклеотидной фосфатной группе, углеводному фрагменту или гетероциклическому основанию.

Модификация олигонуклеотидов направлена на улучшение фармакокинетических и фармакодинамических свойств. Можно выделить некоторую направленность в изменении свойств при введении модификаций, в частности изменение углеводофосфатного остова приводит к повышению нуклеазной стабильности и аффинности к НК, тогда как присоединение заместителей по 3'- и 5'-концам значительно улучшает доставку олигонуклеотидов к органам и проникновение в клетки.

Важно всегда помнить, что одним из фундаментальных свойств олигонуклеотидов является их способность к комплементарным взаимодействиям, поэтому при введении различных модификаций одной из главных задач является сохранение структур и функций, необходимых для взаимодействия с комплементарными участками целевых нуклеиновых кислот. Не случайно, что модификация в большинстве случаев направлена на углеводофосфатный остов [13–18]. Важными аспектами являются повышение специфичности связывания модифицированных олигонуклеоти-

дов с целевыми нуклеиновыми кислотами или НК-связывающими белками, увеличение стабильности этих соединений по отношению к гидролизу клеточными нуклеазами. Тем не менее следует отметить, что в любом случае модификации не должны приводить к появлению токсичных метаболитов [13].

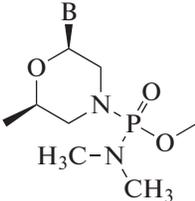
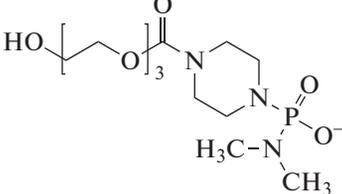
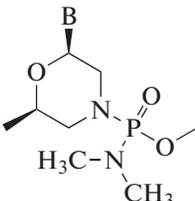
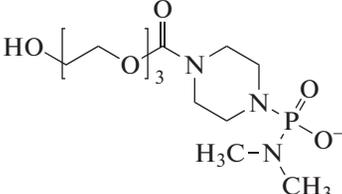
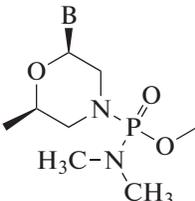
Если ранее речь шла о какой-то конкретной модификации (основными вехами принято считать описанные в обзорах [6–8, 13], в том числе 2'-F (1964), PS (1966), 2'-O-метил (1969), 2'-O-MOE (1978), PMO (1989), PNA (1991), NP (1994), LNA (1998), tc-DNA (2002)), то к настоящему моменту накоплена такая “солидная библиотека” олигонуклеотидных производных, что следует говорить о семействах модификаций. Это можно продемонстрировать на примере 2',4'-мостиковых олигонуклеотидов, описанных в обзоре Wan et al. [13], где приведены сведения о 30-мостиковых аналогах. До сих пор остаются востребованными такие изменения структуры, которые приводят к снижению суммарного заряда модифицированного олигонуклеотида и повышению его гидрофобности [19–23].

К настоящему моменту 11 препаратов [24] на основе олигонуклеотидов были одобрены к использованию в медицинской практике (табл. 1).

Клинические испытания ряда других модифицированных олигонуклеотидов (антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), малых интерферирующих РНК (siРНК), “ловушек”, аптамеров) продолжают. Это указывает на то, что потенциал АСО и других основанных на НК лекарственных препаратов реализуется вполне успешно. Использование синтетических олигонуклеотидов для терапевтических целей требует нового подхода для их рационального дизайна и крупномасштабного синтеза [36]. В то время как более чем 70 кандидатов в лекарственные препараты прошли разные стадии клинических испытаний [6], для значительного количества АСО испытания были прекращены. Список олигонуклеотидов, отклоненных для дальнейшего использования в качестве биомедицинских препаратов, продолжает расти. Причиной может быть неподтвержденная мишень в гене, неправильно подобранная нуклеотидная последовательность АСО, достигнутый уровень нокдауна, недостаточный для терапии, активность АСО вне цели и, что наиболее важно, терапевтический индекс, ограничивающий лечение.

Анализируя данные табл. 1, можно легко заметить, что несмотря на колоссальное число предложенных модификаций, сейчас на практике реально используются лишь несколько (весьма небольшая часть из потенциально возможных) относительно простых. Остальные, не нашедшие пока применения в качестве лекарств, широко применяются в научных исследованиях или находятся на различных стадиях клинических испытаний [37–41].

Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые в качестве лекарственных препаратов

| Препарат                    | Организация (год одобрения) | Межнуклеозидный фосфат     | Углеводный фрагмент или остаток морфолина   | Особенности строения соединения   | Ссылка |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|---|--------|
| Фомивирсен (Fomivirsen)     | FDA (1998), EMA (1999)      | PS, PO                     | 2'-Дезоксирибоза  | ss  | [25]   |
| Пегаптаниб (Pegaptanib)     | FDA (2004)                  | PO                         | 2'-F-2'-дезоксипири-<br>мидиновые<br>и 2'-O-метилпурино-<br>вые нуклеозиды          | ss<br>5'-концевой ПЭГ-линкер,<br>3',3'-межнуклеотидная связь,<br>аптамер                                  | [26]   |
| Мипомерсен (Mipomersen)     | FDA (2013)                  | PS, PO                     | 2'-Дезоксирибоза<br>и 2'-O-(2-метокси-<br>этил)рибоза                               | ss<br>центральная часть – дезокси-<br>нуклеотиды, остальные<br>рибонуклеотиды (гэпмер)                    | [27]   |
| Этеплирсен (Eteplirsen)     | FDA (2016)                  | Диамидофосфат              |    | ss<br>на 5'-конце<br>   | [28]   |
| Нусинерсен (Nusinersen)     | FDA (2016)<br>EMA (2017)    | PS, PO                     | 2'-O-(2-метокси-<br>этил)рибоза   | ss  | [29]   |
| Инотерсен (Inotersen)       | FDA (2018)<br>EMA (2018)    | PS, PO                     | 2'-O-(2-метокси-<br>этил)рибоза   | ss<br>гэпмер  | [30]   |
| Патисиран (Patisiran)       | FDA (2018)<br>EMA (2018)    | PO                         | 2'-O-метилрибоза<br>и 2'-дезоксирибоза  | ds siPHK<br>основная часть – рибонук-<br>леотиды, на 3'-конце по два T                                    | [31]   |
| Воланесорсен (Volanesorsen) | EMA (2019)                  | PS, PO                     | 2'-Дезоксирибоза<br>и 2'-O-(2-метокси-<br>этил)рибоза                               | ss<br>гэпмер  | [32]   |
| Гивосиран (Givosiran)       | FDA (2019)                  | PS на концах,<br>другие PO | 2'-F(A/C/G)<br>2'-O-метил(A/C/G/U)  | ds siPHK<br>на 3'-конце L96<br>("трехантенный" GalNAc)  | [33]   |
| Голодирсен (Golodirsen)     | FDA (2019)                  | Диамидофосфат              |  | ss<br>на 5'-конце<br> | [34]   |
| Вилтоларсен (Viltolarsen)   | MHLW (2020)                 | Диамидофосфат              |  | ss  | [35]   |

Примечание: FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США); EMA – Европейское агентство лекарственных средств; MHLW – Министерство здравоохранения, труда и благосостояния Японии; PS – тиофосфат, PO – фосфат; ss или ds – одно- или дуспиральный.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Поиск лекарственных препаратов на основе самым разным образом модифицированных олигонуклеотидов напоминает теорему Курта Геделя (K.F. Gödel) о неполноте: всякая система математических аксиом, начиная с определенного уровня сложности, либо внутренне противоречива, либо неполна [42]. Клетка, а тем более организм в целом, слишком сложны, а информация о функционировании системы недостаточна, чтобы сконструировать некое универсальное средство для лечения даже уникальной (отдельной) болезни. Данный факт является причиной того, что широкий ряд ДНК-фрагментов, содержащих иногда набор различных модификаций, не доходят даже до самой ранней стадии клинических испытаний, оставаясь в химической лаборатории в качестве новых соединений, но не биомедицинских препаратов.

Химический синтез терапевтических олигонуклеотидов нетривиален, и комбинированные эффекты нескольких модификаций часто непредсказуемы. При выборе модификаций и их положений в НК-фрагменте необходимо руководствоваться эмпирическим тестированием.

Отсутствие противовирусного препарата для борьбы с SARS-CoV-2 привело к использованию различных лекарств, ингибирующих отдельные стадии репликации вирусов [43]. Было бы удивительно, если бы не появились публикации, в которых пока чисто теоретически не были бы предложены направления воздействия на вирус с помощью олигонуклеотидов. Rossi et al. [44] предполагают, что терапевтические средства на основе олигонуклеотидов могут быть нацелены либо на сам вирус, ингибируя его трансмембранный S-белок (spike protein) или воздействуя на его репликационные белки через нарушение НК-белковых взаимодействий (аптамеры), либо направлены на вирусный геном через подавление экспрессии генов (gene silencing), опосредованное siРНК или АСО. Подходы, заставляющие гены “молчать”, могут уменьшить воспалительные эффекты в легких и других органах, приводящие к смертности в тяжелых случаях COVID-19.

В настоящее время можно предположить, что олигонуклеотидные препараты найдут достойное применение при лечении различных заболеваний, в том числе наследственных и орфанных (редких), а также в диагностике и в персонализированной медицине будущего.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

1. *Watson J.D., Crick F.H.* // *Nature*. 1953. V. 171. P. 737–738.  
<https://doi.org/10.1038/171737a0>
2. *Franklin R.E., Gosling R.G.* // *Nature*. 1953. V. 171. P. 740–741.  
<https://doi.org/10.1038/171740a0>
3. *Wilkins M.H., Stokes A.R., Wilson H.R.* // *Nature*. 1953. V. 171. P. 738–740.  
<https://doi.org/10.1038/171738a0>
4. *Watson J.D.* // *The Double Helix: a Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*. New York: Atheneum, 1968.
5. *Maddox B.* *Rosalind Franklin: The Dark Lady of DNA*. New York: HarperCollins, 2002.
6. *Agrawal S., Gait M.J.* Chapter 1: History and Development of Nucleotide Analogues in Nucleic Acid Drugs // *In Advances in Nucleic Acid Therapeutics*. 2019. P. 1–21.  
<https://doi.org/10.1039/9781788015714-00001>
7. *Lundin K.E., Gissberg O., Smith C.I.E., Zain R.* // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 2036. P. 3–16.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9670-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9670-4_1)
8. *Glazier D.A., Liao J., Roberts B.L., Li X., Yang K., Stevens C.M., Tang W.* // *Bioconjugate Chem.* 2020. V. 31. P. 1213–1233.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00060>
9. *Michelson A.M., Todd A.R.* // *J. Chem. Soc.* 1955. P. 2632–2638.  
<https://doi.org/10.1039/JR9550002632>
10. *Caruthers M.H., Khorana H.G.* // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 72. P. 407–426.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90154-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90154-4)
11. *Caruthers M.H.* // *Science*. 1985. V. 230. P. 281–285.  
<https://doi.org/10.1126/science.3863253>
12. *Lundin K.E., Gissberg O., Smith C.I.E.* // *Hum. Gene Ther.* 2015. V. 26. P. 475–485.  
<https://doi.org/10.1089/hum.2015.070>
13. *Wan W.B., Seth P.P.* // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. P. 9645–9667.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00551>
14. *Прохорова Д.В., Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Фокина А.А., Стеценко Д.А.* // *Биоорг. химия*. 2017. Т. 43. С. 45–50. [*Prokhorova D.V., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 38–42.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162017010071>
15. *Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A.* // *PNAS*. 2019. V. 116. P. 1229–1234.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>
16. *Zatsepin T.S., Oretskaya T.S., Stetsenko D.A., Gait M.J.* // *Bioconjugate Chemistry*. 2005. V. 16. P. 471–489.  
<https://doi.org/10.1021/bc049712v>
17. *Dolinnaya N.G., Zubin E.M., Kubareva E.A., Zatsepin T.S., Oretskaya T.S.* // *Current Organic Chemistry*. 2009. V. 13. P. 1029–1049.  
<https://doi.org/10.2174/138527209788680745>
18. *Хомякова Е.А., Казанова Е.В., Зубин Е.М., Кубарева Е.А., Молочков Н.В., Рязанова Е.М., Орецкая Т.С.* // *Биоорг. химия*. 2010. Т. 36. С. 343–353. [*Khomyakova E.A., Kazanova E.V., Zubin E.M., Kubareva E.A., Molochkov N.V., Ryazanova E.M., Oretskaya T.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 315–324.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162010030064>

19. Yanachkov I., Zavizion B., Metelev V., Stevens L.J., Tabatadze Y., Yanachkova M., Wright G., Krichevsky A.M., Tabatadze D.R. // *Org. Biomol. Chem.* 2017. V. 15. P. 1363–1380.  
<https://doi.org/10.1039/c6ob02576e>
20. Metelev V.G., Bogdanov A.A., Jr. // *Theranostics*. 2020. V. 10. P. 1391–1414.  
<https://doi.org/10.7150/thno.37936>
21. Markov O.V., Filatov A.V., Kupryushkin M.S., Chernikov I.V., Patutina O.F., Strunov A.A., Chernolovskaya E.L., Vlasov V.V., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 3663.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25163663>
22. Chernikov I.V., Meschaninova M.I., Chernolovskaya E.L. // *Methods in Molecular Biology*. 2020. V. 2115. P. 57–77.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0290-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0290-4_3)
23. Osborn M.F., Coles A.H., Biscans A., Haraszti R.A., Roux L., Davis S., Ly S., Echeverria D., Hassler M.R., Godinho B.M.D.C., Nikan M., Khvorova A. // *Nucleic Acids Research*. 2019. V. 47. P. 1070–1081.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1232>
24. Kuijper E.C., Bergsma A.J., Pijnappel W.W.M.P., Aartsma-Rus A. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2020.  
<https://doi.org/10.1002/jimd.12251>
25. Stix G. // *Sci. Am.* 1998. V. 279. P. 50.  
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican1198-46b>
26. Doggrell S.A. // *Expert Opin. Pharmacother.* 2005. V. 6. P. 1421–1423.  
<https://doi.org/10.1517/14656566.6.8.1421>
27. Hair P., Cameron F., McKeage K. // *Drugs*. 2013. V. 73. P. 487–493.  
<https://doi.org/10.1007/s40265-013-0042-2>
28. Aartsma-Rus A., Krieg A.M. // *Nucl. Acid. Ther.* 2017. V. 27. P. 1–3.  
<https://doi.org/10.1089/nat.2016.0657>
29. Aartsma-Rus A. // *Nucl. Acid. Ther.* 2017. V. 27. P. 67–69.  
<https://doi.org/10.1089/nat.2017.0665>
30. Benson M.D., Waddington-Cruz M., Berk J.L., Polydefkis M., Dyck P.J., Wang A.K., Planté-Borde-neuve V., Barroso F.A., Merlini G., Obici L., Scheinberg M., Brannagan T.H., Litchy W.J., Whelan C., Drachman B.M., Adams D., Heitner S.B., Conceição I., Schmidt H.H., Vita G., Campistol J.M., Gamez J., Gorevic P.D., Gane E., Shah A.M., Solomon S.D., Monia B.P., Hughes S.G., Kwok T.J., McEvoy B.W., Jung S.W., Baker B.F., Ackermann E.J., Gertz M.A., Coelho T. // *N. Engl. J. Med.* 2018. V. 379. P. 22–31.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716793>
31. Hoy S.M. // *Drugs*. 2018. V. 78. P. 1625–1631.  
<https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>
32. Yang X., Lee S.R., Choi Y.S., Alexander V.J., Digenio A., Yang Q., Miller Y.I., Witzum J.L., Tsimikas S. // *J. Lipid Res.* 2016. V. 57. P. 706–713.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.M066399>
33. Sardh E., Harper P., Balwani M., Stein P., Rees D., Bissell D.M., Desnick R., Parker C., Phillips J., Bonkovsky H.L., Daphne Vassiliou D., Penz C., Chandaniels A., He Q., Querbes W., Fitzgerald K., Kim J.B., Garg P., Akshay Vaishnav A., Amy R., Simon A.R., Anderson K.E. // *N. Engl. J. Med.* 2019. V. 380. P. 549–558.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1807838>
34. Heo Y.A. // *Drugs*. 2020. V. 80. P. 329–333.  
<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01267-2>
35. Roshmi R.R., Yokota T. // *Drugs Today (Barc)*. 2019. V. 55. P. 627–639.  
<https://doi.org/10.1358/dot.2019.55.10.3045038>
36. Obika S., Sekine M. // *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides*. Springer, Singapore. 2018. V. VIII. P. 284.  
<https://doi.org/10.1007/978-981-13-1912-9>
37. Zubin E.M., Анцыпович С.И., Орецкая Т.С., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташлицкий В.Н., Шабарова З.А. // *Биоорг. химия*. 1997. Т. 23. С. 809–816. [Zubin E.M., Antsyovich S.I., Oretskaya T.S., Romanova E.A., Volkov E.M., Tashlitskii V.N., Shabarova Z.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 1997. V. 23. P. 730–736.]
38. Naryshkin N.A., Farrow M.A., Ivanovskaya M.G., Oretskaya T.S., Shabarova Z.A., Gait M.J. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 3496–3505.  
<https://doi.org/10.1021/bi962789p>
39. Monakhova M., Ryazanova A., Hentschel A., Viryasov M., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. // *Journal of Chromatography A*. 2015. V. 1389. P. 19–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.045>
40. Rechkunova N.I., Lavrik O.I. // *Photochemistry and Photobiology*. 2020. V. 96. P. 440–449.  
<https://doi.org/10.1111/php.13222>
41. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. // *DNA Repair*. 2020. V. 90. P. 102847.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102847>
42. Курт Гедель // О формально неразрешимых предложениях Principia Mathematica и родственных систем. 1992 / перевод Б. Мельцер, всестороннее введение Р. Брейтуэйт. Дуврское переиздание издания Basic Books 1962 года. ISBN 0-486-66980-7
43. Kupferschmidt K., Cohen J. // *Science*. 2020. V. 367. P. 1412–1413.  
<https://doi.org/10.1126/science.367.6485.1412>
44. Rossi J.J., Rossi D. // *Nucleic Acid Ther.* 2020. V. 30. P. 129–132.  
<https://doi.org/10.1089/nat.2020.0868>

## Modified Oligonucleotides: New Structures, New Properties, New Spheres of Application

V. G. Metelev\* and T. S. Oretskaya\*,#

#Phone: +7 (916) 206-41-02; fax: +7 (495) 939-31-81; e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

\*Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry and Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia

Nucleic acids have come a long and arduous journey “from the bench to the bedside.” At present, it can be assumed that drugs based on modified oligonucleotides will find a worthy application in personalized medicine of the future.

*Keywords: modified nucleic acids, oligonucleotide therapeutics, antisense oligonucleotides*



УДК 577.113.4

## ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 2021 г. С. А. Жуков\*, Д. В. Пышный\*, \*\*, М. С. Купрюшкин\*, #

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

\*\*ФГБОУ ВПО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”,  
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 24.09.2020 г.

После доработки 30.09.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

В данной работе были получены новые представители класса фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных производных. Предложена и осуществлена синтетическая схема, позволяющая получать из различных вторичных аминов широкий набор диаминокарбенилазидов для последующего введения тетразамещенных гуанидиновых остатков в состав олигонуклеотидов по реакции Штаудингера. Был выявлен ряд факторов, влияющих на выход фосфорилгуанидинового производного, таких как размер алкильных заместителей в составе используемого азидо и его чистота, а также проведение процедуры элиминирования защитной цианэтильной группы, предшествующей финальному деблокированию олигонуклеотида.

*Ключевые слова:* автоматизированный синтез олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды, органические азиды, реакция Штаудингера, фосфорилгуанидины, фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО)

DOI: 10.31857/S0132342321020299

### ВВЕДЕНИЕ

Синтетические олигонуклеотиды в настоящее время нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и медицины. На данный момент более 10 олигонуклеотидных препаратов уже одобрены организацией FDA (Food and Drug Administration), а более 40 препаратов находятся на различных стадиях клинических испытаний [1–3]. Для терапевтического применения олигонуклеотидов особое значение имеют такие свойства, как химическая и энзиматическая устойчивость, эффективность проникновения в клетки и биораспределение, которые достигаются введением различных модификаций в состав создаваемых НК-конструкций [4].

Существует множество путей введения химических модификаций в структуру олигонуклеотидов [5, 6], при этом реализация большинства из них зачастую является отдельной синтетической

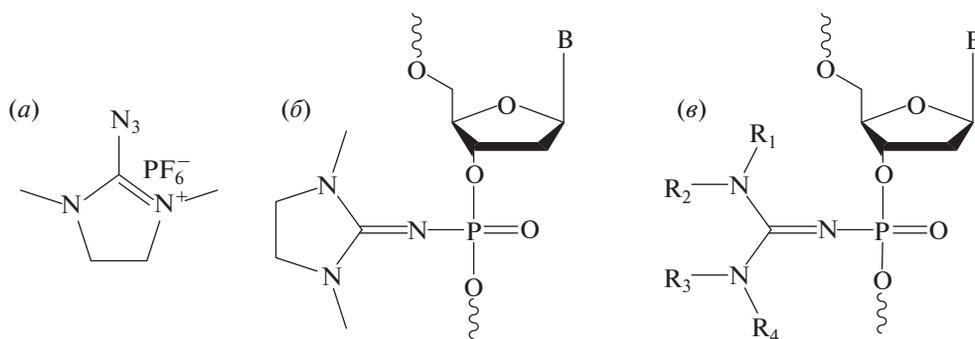
задачей. Разработка подходов, позволяющих унифицировать процедуру введения различных модификаций и их комбинаций в состав олигонуклеотида, является актуальным технологическим этапом, а применение способов, совместимых с протоколами твердофазного амидофосфитного синтеза, позволяет сделать создание различных олигонуклеотидных конструкций рутинной процедурой.

В Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН был разработан новый класс НК-производных – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды [7]. Для их получения использовали окисление фосфиттриэфирной группы (промежуточного продукта олигонуклеотидного синтеза) тетразамещенным диаминокарбенилазидом по реакции Штаудингера. В настоящее время эффективность данного подхода продемонстрирована на примере коммерчески доступного диаминокарбенилазида – гексафторфосфата 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния (ADMP) [8]. Новый класс соединений и метод их получения в настоящий момент запатентованы в России и Японии и находится на стадии патентования в национальных ведомствах других стран [9].

Данный подход позволяет вводить замещенные гуанидиновые остатки по межнуклеотидному фос-

Сокращения: ADMP – гексафторфосфат 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния; CPG – стекло с контролируемым размером пор (controlled pore glass); DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин; НК – нуклеиновая кислота; офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

# Автор для связи: (тел.: +7 (923) 243-26-23; эл. почта: kuprumax@gmail.com; pyshnyi@niboch.nsc.ru).



**Рис. 1.** (а) – Гексафторфосфат 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния (ADMP) – единственный коммерчески доступный диаминокарбенийазид; (б) – фосфорилгуанидиновое производное олигонуклеотида с 1,3-диметилимидазолидиновой группой; (е) – фосфорилгуанидиновое производное олигонуклеотида с различными заместителями R<sub>1</sub>–R<sub>4</sub>.

фату олигонуклеотидной цепи с высокой эффективностью, даже в случае получения олигонуклеотидов с полностью модифицированным остовом. Реакция не требует применения высококонцентрированных растворов и нагревания, что позволило адаптировать метод введения данной модификации к автоматическому синтезу олигонуклеотидов на ДНК/РНК-синтезаторах.

Данная статья посвящена разработке схемы синтеза различных тетразамещенных диаминокарбенийазидов и получения новых представителей класса фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов по реакции Штаудингера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение тетразамещенных диаминокарбенийазидов.** В настоящее время единственным коммерчески доступным диаминокарбенийазидом является ADMP (рис. 1а), используемый для введения 1,3-диметилимидазолидиновой группы в состав олигонуклеотидного остова (рис. 1б). Для получения фосфорилгуанидиновых производных с другими заместителями (рис. 1е) необходимо разработать схему синтеза соответствующих диаминокарбенийазидов.

Для синтеза набора азидов-модификаторов, несущих различные заместители, была выбрана схема, включающая следующие этапы: получение замещенной мочевины, конвертацию мочевины в соответствующий диаминокарбенийхлорид и замещение атома хлора на азидогруппу.

Учитывая трудоемкость получения несимметричных замещенных мочевины, было решено использовать различные вторичные амины как исходные соединения, содержащие различные функциональные остатки. В качестве карбонилирующего агента был выбран тиофосген (рис. 2, стадия (1)). Далее взаимодействием с оксалилхлоридом тиомочевинны конвертировали в диаминокарбенийхлориды (рис. 2. стадия (2)), так называемые соли

Вильсмайера [10]. Для получения диаминокарбенийазидов действием азидата натрия замещали атом хлора на азидогруппу (рис. 2, стадия (3)) [11].

В качестве исходных соединений для получения целевых азидов были выбраны вторичные амины с алкильными заместителями различной длины (рис. 3, (IIIa–VIa)), а также тетраметилмочевина (рис. 3, (Ib)) и коммерчески доступная соль Вильсмайера (рис. 3, (IIc)) для синтеза азидов по сокращенной схеме. На первой стадии синтеза взаимодействием тиофосгена с избытком вторичного амина получали симметричные тетразамещенные тиомочевинны (IIIb–VIb). Для связывания образующегося HCl в реакционную смесь добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (DIPEA) либо, если образующаяся соль используемого амина (Va) и (VIa) выпадала в осадок, вносили дополнительное количество такого амина. Получаемые тиомочевинны отделяли от избытка амина и побочных продуктов методом колоночной хроматографии. Полноту протекания реакций и чистоту образующихся продуктов контролировали при помощи анализа методами ТСХ и <sup>1</sup>H-ЯМР.

На следующей стадии взаимодействием тиомочевин с оксалилхлоридом получали диаминокарбенийхлориды, так называемые соли Вильсмайера. В ходе реакции образуются газообразные CO и CSO, что позволяет избежать необходимости очистки целевого продукта от продуктов деградации используемого реагента. Кроме того, оксалилхлорид обладает достаточно низкой температурой кипения (61 °C), что позволяет отделять его избыток от реакционной смеси при упаривании. В данной реакции образуется соль Вильсмайера с анионом Cl<sup>-</sup>, но для повышения растворимости конечного продукта в органических растворителях противоион замещали на гексафторфосфат в реакции обмена с солью KPF<sub>6</sub> [12], после чего отделяли реакционную смесь от осадка хлорида калия фильтрованием.

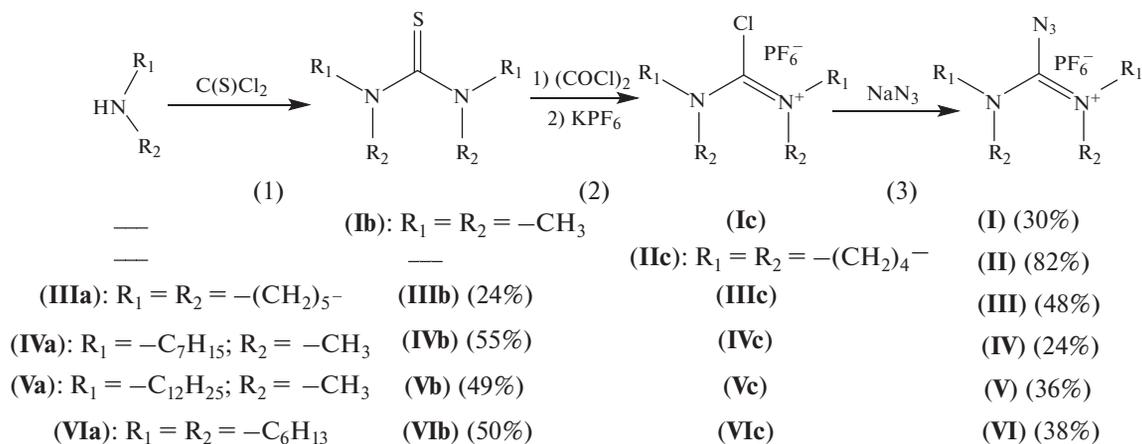


Рис. 2. Схема получения диаминокарбонийазидов: (1) – получение тиомочевины; (2) – получение соли Вильсмайера; (3) – замещение атома хлора на азидогруппу.

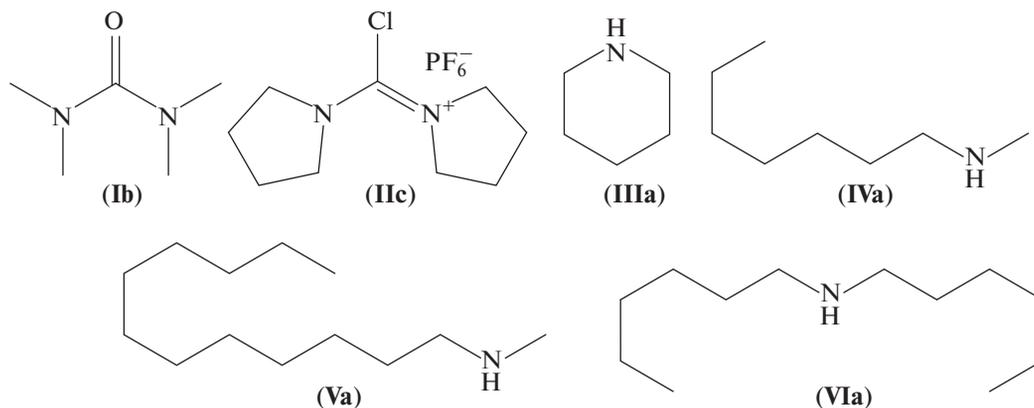


Рис. 3. Соединения-предшественники для получения диаминокарбонийазидов: тетраметилмочевина (Ib); гексафторфосфат хлоридопирролидинокарбония (IIc); амины: пиперидин (IIIa), *N*-гептилметиламин (IVa), *N*-додецилметиламин (Va), дигексиламин (VIa).

Поскольку соли Вильсмайера обладают крайне высокой реакционной способностью, данные соединения не выделяли, и после фильтрования и упаривания получаемую реакционную смесь вводили в реакцию с азидом натрия для замещения атома хлора на азидогруппу. Азид натрия мало растворим в органических растворителях, поэтому для проведения реакции использовали суспензию азидата натрия в ацетонитриле. Анализ <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров полученных азидов показал, что сигналы, соответствующие примесям непрореагировавших веществ и возможным продуктам их деградации, составляют не более 10% от суммарной интенсивности. Таким образом, реакции получения соли Вильсмайера и замещения атома хлора на азидогруппу протекают с высокой эффективностью.

С использованием разработанной синтетической схемы был получен набор из шести азидов-модификаторов (рис. 4).

**Использование синтезированных азидов для введения модификаций в состав олигонуклеотидов.** Для проверки эффективности протекания реакции Штаудингера с использованием полученных азидов-модификаторов были синтезированы модельные октатимидилаты 5'-T\*TTTTTT-3' (рис. 5). После этапа присоединения мономера стадии окисления не проводили, автоматический синтез останавливали, реактор вынимали из синтезатора, полимерный носитель (CPG) с иммобилизованным фосфиттриэфиром переносили из реактора в пластиковую пробирку и проводили реакцию Штаудингера с раствором диаминокарбонийазидов. Затем переносили носитель в реактор для синтеза олигонуклеотидов, после чего продолжали обработки в рамках автоматизированного твердофазного синтеза.

Эффективность введения модификации (конверсию) оценивали по профилю оФВЭЖХ как отношение площади пика, соответствующего моди-

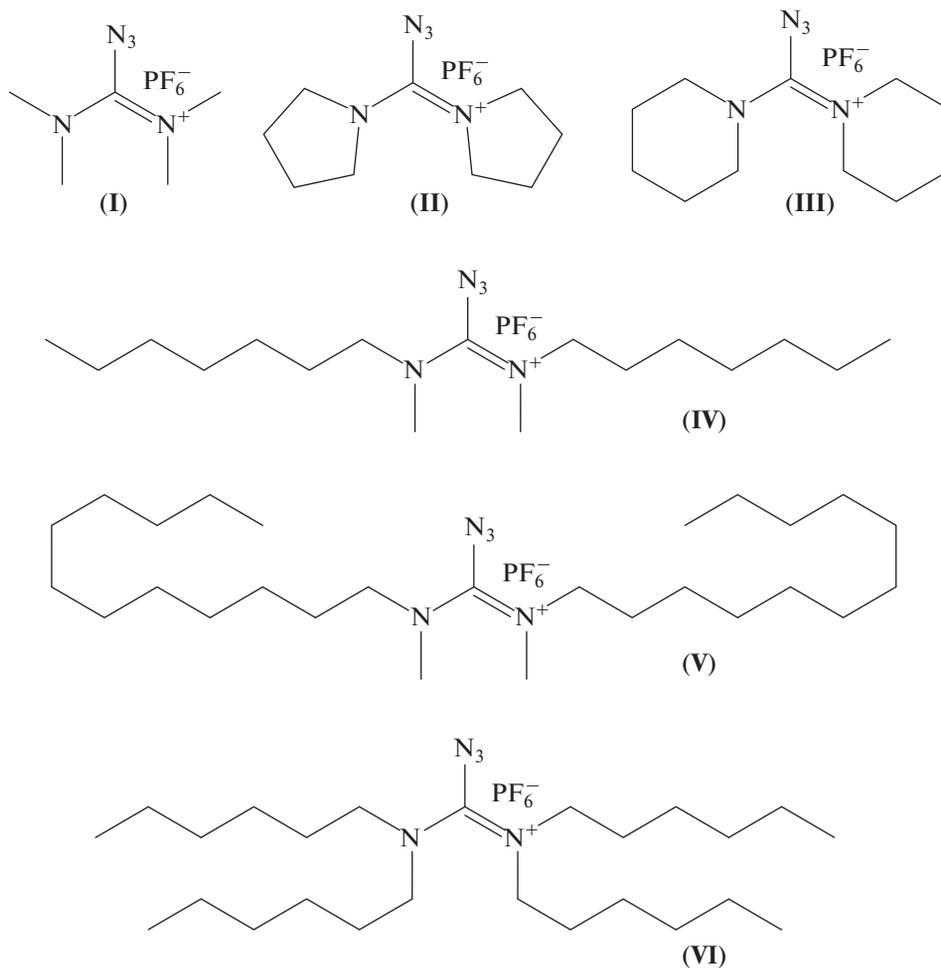


Рис. 4. Библиотека синтезированных диаминокарбенийазидов.

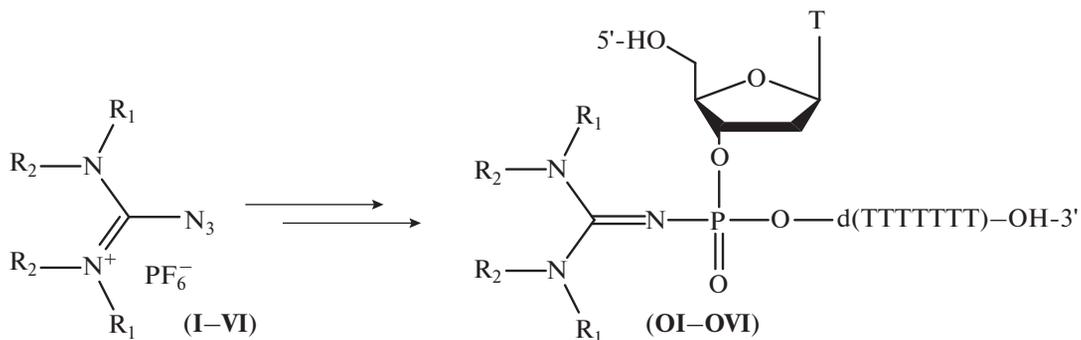


Рис. 5. Схема введения модификации в состав модельного октатимидилата 5'-T\*TTTTTTT-3' по реакции Штаудингера. (I) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>; (II) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-; (III) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-; (IV) R<sub>1</sub> = -C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>; (V) R<sub>1</sub> = -C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>, R<sub>2</sub> = -CH<sub>3</sub>; (VI) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>.

фицированному олигонуклеотиду, к суммарной площади пиков на хроматограмме. Для обеспечения введения модификации с эффективностью не менее 50% при проведении реакции Штаудингера в большинстве случаев использовали концен-

трированные 1 М растворы азидов-модификаторов в ацетонитриле при умеренном нагревании (40°C). Условия, значения конверсии введения модификаций, а также результаты масс-спектрометрии полученных представителей класса

**Таблица 1.** Эффективность введения различных модификаций олигонуклеотида 5'-Т\*ТТТТТТТТ-3' (\* – место введения модификации по межнуклеотидному фосфату) и результаты масс-спектрометрического анализа модифицированных олигонуклеотидов

| Шифр азида | Шифр олигонуклеотида | Условия           | Конверсия, % | $M_{Г(теор)}$ , г/моль | $M_{Г(эксп)}$ , г/моль |
|------------|----------------------|-------------------|--------------|------------------------|------------------------|
| (I)        | (OI)                 | 1 М, 40°C, 1 ч    | ~80          | 2467.5                 | 2467.5                 |
| (II)       | (OII)                | 0.25 М, 40°C, 1 ч | ~90          | 2519.5                 | 2519.4                 |
| (III)      | (OIII)               | 1 М, 40°C, 1 ч    | ~70          | 2547.6                 | 2547.6                 |
| (IV)       | (OIV)                | 1 М, 40°C, 1 ч    | ~60          | 2635.8                 | 2635.7                 |
| (V)        | (OV)                 | 1 М, 50°C, 6 ч    | ~50          | 2775.9                 | 2775.8                 |
| (VI)       | (OVI)                | 1 М, 40°C, 1 ч    | 0            | –                      | –                      |
| ADMP       | (OVII)               | 0.1 М, 40°C, 1 ч  | ~90          | 2465.4                 | 2465.5                 |
| –          | T8                   | –                 | –            | 2370.4                 | 2370.4                 |

Примечание: для олигонуклеотида (OVI) не приведены значения массы, т.к. масс-спектр не регистрировали.

фосфорилгуанидинов представлены в табл. 1. Кроме того, в табл. 1 приведено значение конверсии при использовании коммерчески доступного азида ADMP, получаемое при введении модификации в ручном режиме по описанному выше протоколу. Стоит отметить, что при проведении реакции с ADMP в автоматическом режиме синтеза значения конверсии превышают 99% [8].

Анализируя значения конверсии, можно выявить закономерность: эффективность введения модификации падает с нарастанием размера алкильных заместителей, что можно объяснить стерическими затруднениями при взаимодействии азидов с фосфиттриэфирной группой в составе растущей олигонуклеотидной цепи. В случае азидов (VI), содержащего четыре гексильных заместителя, реакция Штаудингера не протекает вовсе (конверсия 0%). Для азидов (V), содержащего две метильные и две объемные додецильные группы, при проведении реакции в течение 1 ч при 40°C наблюдалось низкое значение конверсии (10%), и только при повышении температуры до 50°C и существенном увеличении времени (6 ч) эффективность введения модификации увеличилась до 50%. В то же время для азидов (II), содержащих компактные циклические заместители, высокое значение конверсии (~90%) было достигнуто при 40°C и более низкой концентрации азидопроизводного (0.25 М).

На рис. 6а представлены профили оФВЭЖХ реакционных смесей полученных модифицированных олигонуклеотидов. Пик со временем удерживания 6.8 мин соответствует немодифицированному олигонуклеотиду (градиент ацетонитрила 0–50% за 15 мин). Более гидрофобные фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды имеют большее время удерживания, увеличивающееся с нарастанием размера алкильных заместителей. Для анализа наиболее гидрофобного производного (OV), содержащего додецильные остатки, был использован градиент ацетонитрила 0–90% (рис. 6б).

Несимметричность (OI, OIV, OV) или раздвоенность (OII, OIII) пиков, соответствующих целевым продуктам синтеза, обусловлена существованием двух диастереомерных форм модифицированных олигонуклеотидов, имеющих различное время удерживания.

Кроме того, был проведен эксперимент по исследованию электрофоретической подвижности синтезированных олигонуклеотидов в условиях денатурирующего ПААГ-электрофореза (рис. 7). Меньшая электрофоретическая подвижность модифицированных олигонуклеотидов в сравнении с нативным олигонуклеотидом равной длины объясняется наличием в них незаряженной фосфорилгуанидиновой группы. Снижение суммарного заряда олигонуклеотида при сохранении его длины приводит к уменьшению электрофоретической подвижности. С нарастанием размеров алкильных заместителей подвижность уменьшается незначительно.

**Влияние предварительного элиминирования цианэтильной группы на эффективность конверсии реакции модификации олигонуклеотидов.** В первоначально проведенных экспериментах по введению модификации на примере азидов (II) даже в сравнительно жестких условиях (1 М, 40°C, 1 ч) значения конверсии не превышали 50%, а в качестве единственного побочного продукта присутствовал соответствующий немодифицированный олигонуклеотид (рис. 8, кривая 1).

При этом в случае использования азидов (VI), когда обнаружить целевой продукт не удавалось вовсе, на хроматографическом профиле реакционной смеси можно отчетливо наблюдать два пика, соответствующих продуктам деградации неокисленного фосфиттриэфирного производного. Такой же профиль хроматографии наблюдался в случае контрольного эксперимента, в котором при синтезе октатимидилата последнее звено вводили без проведения стадии окисления (рис. 8, кривая 2). Данное наблюдение позволило предположить,

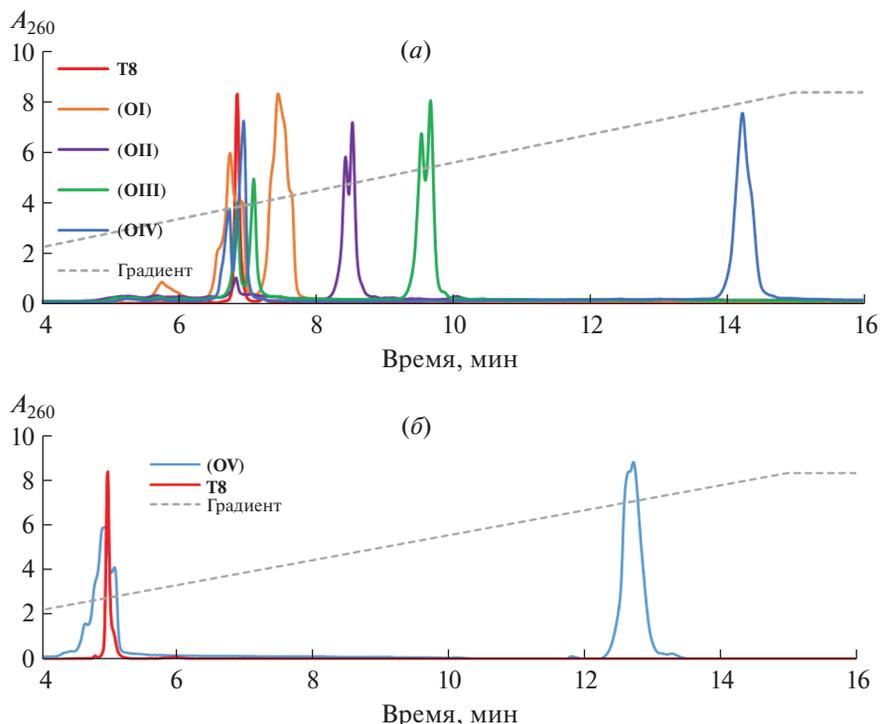


Рис. 6. (а) – Профили офВЭЖХ олигонуклеотидов (OI–OIV). Градиент ацетонитрила 0–50% за 15 мин; (б) – профиль офВЭЖХ олигонуклеотида (OV). Градиент ацетонитрила 0–90% за 15 мин. T8 – контрольный октагидроимидат.

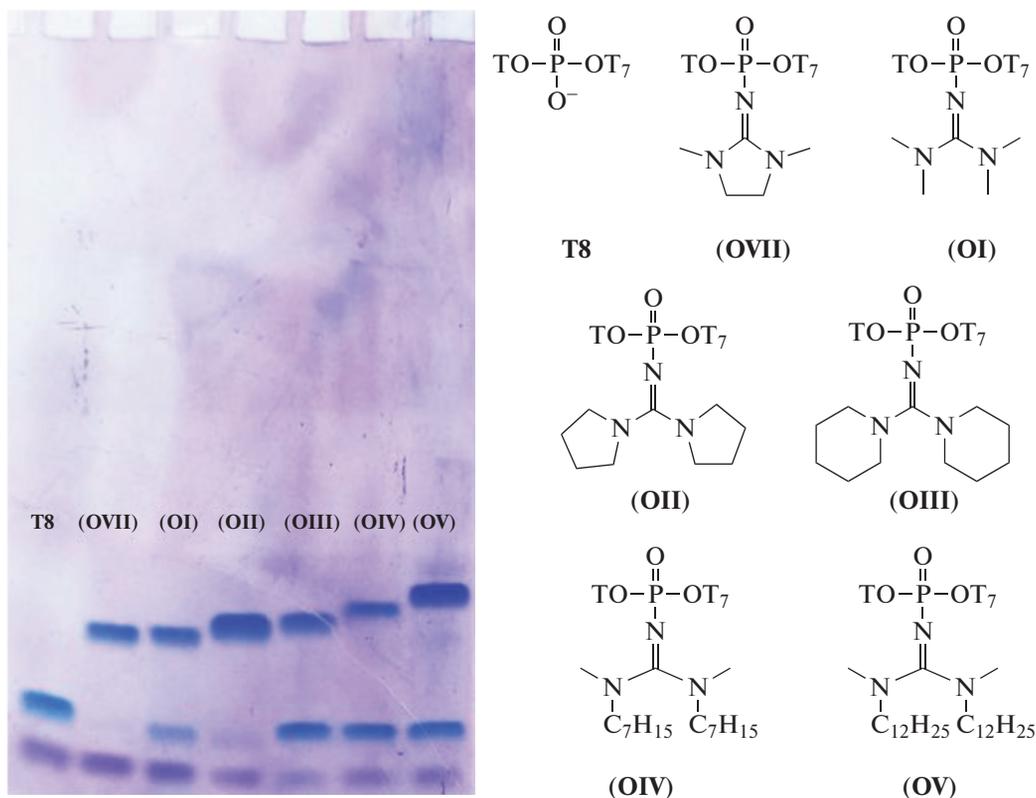
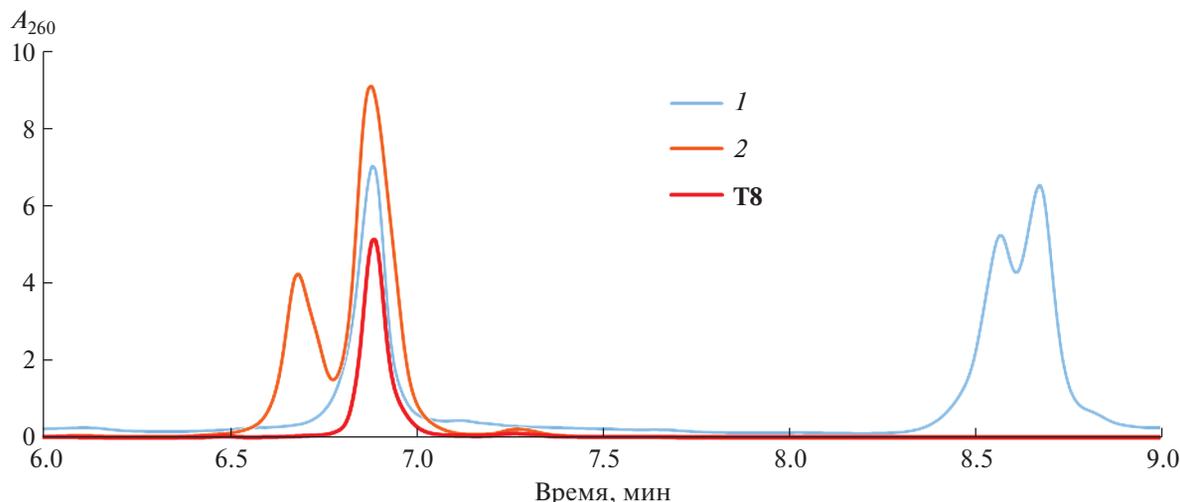
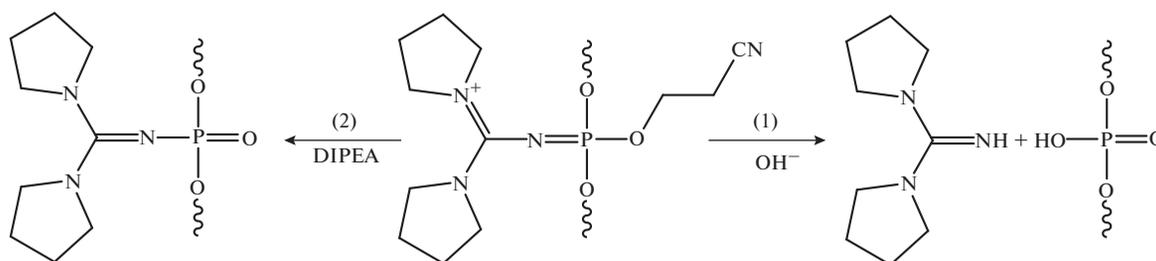


Рис. 7. Подвижность модифицированных олигонуклеотидов (OI–OV) и (OVII), а также контрольного немодифицированного олигонуклеотида (T8) в условиях денатурирующего электрофореза в 15%-ном ПААГ.



**Рис. 8.** Профили офВЭЖХ олигонуклеотидов: 1 – введение модификации с использованием азида (II) без предварительного элиминирования (5'-T\*TTTTTTT-3'); 2 – контрольный эксперимент, последний мономер присоединили без стадии окисления (5'-T\*TTTTTTT-3'). T8 – контрольный октатимидилат. Градиент ацетонитрила 0–50% за 15 мин.



**Рис. 9.** Возможные пути превращения промежуточного фосфазенового продукта: (1) – побочная реакция в ходе пост-синтетической обработки, приводящая к образованию нативного олигонуклеотида; (2) – элиминирование цианэтильной группы действием DIPEA.

что низкие значения конверсии реакции модификации азидом (II) объясняются не низкой реакционной способностью используемого азида, а щелочным гидролизом получающегося фосфазенового производного (промежуточного продукта реакции Штаудингера) при финальном деблокировании синтезируемого олигонуклеотида водным раствором аммиака или метиламина (рис. 9, (1)).

Для предотвращения протекания данной побочной реакции в протокол синтеза модифицированной олигонуклеотидной цепи после проведения реакции Штаудингера был введен этап обработки 10%-ным раствором DIPEA в ацетонитриле в течение 20 мин при 40°C для элиминирования защитной цианэтильной группы, что приводило к превращению фосфазенового остатка в стабильный фосфорилгуанидин еще до проведения финального деблокирования олигонуклеотида [13] (рис. 9, (2)).

Предварительное элиминирование цианэтильной группы привело к увеличению конверсии до значений >90%. В дальнейшем при введении всех

модификаций использовали обработку 10%-ным раствором DIPEA в ацетонитриле. Значения конверсии, представленные в табл. 1, соответствуют экспериментам, проведенным с предварительным элиминированием цианэтильной группы до финального деблокирования олигонуклеотидного производного.

Еще одним наблюдением является увеличение выхода целевого продукта при синтезе олигонуклеотида с модификацией межнуклеотидного звена, отличного от 5'-терминальной позиции, даже без этапа обработки раствором DIPEA. Так, для олигонуклеотида 5'-TT\*TTTTTTT-3' конверсия составила 70%. Данное наблюдение однозначно указывает на возможность протекания процесса элиминирования цианэтильной группы в составе фосфазенового остатка при прохождении полного синтетического цикла по стандартному амидо-фосфитному протоколу.

При синтезе модельного олигонуклеотида 5'-T\*TTTTTTT-3' по протоколу с двукратно увеличенным этапом кэпирования, следующим сра-

зу после этапа реакции Штаудингера, конверсия возросла до 90%. Вероятно, раствор *N*-метилимидазола в пиридине, обработка которым является частью протокола кэпирования, способен обеспечивать элиминирование цианэтильной группы при атоме фосфора в составе фосфазенового производного, чего не наблюдается в случае менее реакционноспособного “немодифицированного” фосфиттриэфирного звена растущей цепи.

Таким образом, при синтезе фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов возможно проводить необходимый этап элиминирования защитной группы в автоматическом режиме, используя растворы и реагенты, применяемые в стандартном амидофосфитном протоколе олигонуклеотидного синтеза.

Интересно отметить, что для различных азидов степень влияния предварительного этапа  $\beta$ -элиминирования на значение конверсии различна. Так, при использовании азида ADMP значения конверсии синтеза олигонуклеотида 5'-T\*TTTTTTT-3' с этапом  $\beta$ -элиминирования и при его отсутствии составляют 90 и 60% соответственно. Вероятно, алкильные заместители при гуанидиновом остатке в составе получаемого фосфазенового производного способны влиять на распределение между продуктами щелочного гидролиза при финальном деблокировании синтезируемого олигонуклеотида.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты и растворители.** В работе были использованы следующие реагенты и растворители: гексафторфосфат калия, дигексиламин, *N*-гептилметиламин, *N*-додецилметиламин, пиперидин, гексафторфосфат хлородипирролидинокарбения (Sigma Aldrich, США); ацетонитрил, азид натрия, триэтиламин, диизопропилэтиламин (Panreac, Испания); гексафторфосфат 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния, оксалилхлорид (TCI, Япония); дихлорметан, водный раствор аммиака, этиловый спирт, толуол (Реахим, Россия); тиофосген (Fluka, Швейцария); тетраметилмочевина (Merck, Германия).

Для ТСХ использовали пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия), для колоночной адсорбционной хроматографии — колонку объемом 200 мл, заполненную рассчитанным количеством сорбента Kieselgel 60 (размер частиц 0.060–0.200 мм, размер пор 60 Å; Merck, Германия).

Для упаривания водных растворов использовали вакуумный концентратор SpeedVac (ThermoFisher, США), для упаривания органических растворов — Rotavapor R200 (Buchi, Швейцария). Получаемые соединения высушивали в эксикаторе до постоянной массы.

**Хроматографический анализ.** Полученные олигонуклеотиды анализировали методом офВЭЖХ

на хроматографе Милихром А02 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C18, 2 × 75 мм (Эконова, Россия). Анализ проводили в системе “0.02 М ацетат триэтиламония — 90%-ный ацетонитрил”, градиент ацетонитрила 0–90% за 30 мин, поток 200 мкл/мин, температура термостата 35°C. Детекцию осуществляли при длине волны 260 нм.

**Электрофорез** проводили в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид : *N,N'*-метиленбисакриламид (30 : 1), 8 М мочевины, 89 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na<sub>2</sub>-EDTA) в буферном растворе TBE (89 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na<sub>2</sub>-EDTA) при напряжении 50 В/см. Олигонуклеотидные образцы наносили на гель в растворе 8 М мочевины, содержащем 0.05% ксиленицианола FF и 0.05% бромфенолового синего. Результаты электрофоретического разделения визуализировали при помощи красителя Stains-all.

**Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР** регистрировали на спектрометре Spinsolve 80 (Magritek, Германия; 80 МГц).

**Масс-спектрометрия.** Молекулярные массы олигонуклеотидов и олигонуклеотидных аналогов определяли с помощью масс-спектрометрии (ионизация методом электрораспыления) на приборе G6410A LCMS/MS (Agilent, США). Образцы олигонуклеотидов готовили растворением в 20 мМ триэтиламоний ацетате в 60%-ном водном ацетонитриле до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл. Для анализа использовали 80%-ный водный ацетонитрил в качестве элюента при скорости потока 0.1 мл/мин в режиме регистрации отрицательных заряженных ионов.

Все реакции проводили без доступа воздуха в атмосфере аргона. Абсолютирование органических растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием над молекулярными ситами или гидридом кальция.

**Синтез олигонуклеотидов** осуществляли на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) согласно стандартному протоколу твердофазного амидофосфитного синтеза, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и соответствующие пористые стекла (Glen Research, США).

Для получения олигонуклеотидов, содержащих модифицированные звенья, присоединение соответствующего мономера проводили без стадий кэпирования, окисления и деблокирования. Затем реактор вынимали из синтезатора, полимерный носитель (CPG) с иммобилизованным промежуточным продуктом переносили из реактора в пластиковую пробирку и обрабатывали раствором азидо-модификатора, после чего обрабатывали промежуточный продукт 10%-ным раствором *N,N*-диизопропилэтиламина в ацетонитриле в течение 20 мин при 40°C. Далее переносили CPG в реактор, и все последующие обработки прово-

дили в условиях автоматического твердофазного синтеза.

**Органический синтез. Бис(пентаметилен)тио-мочевина (IIIb).** К раствору пиперидина (1.3 мл, 12.7 ммоль) в 6 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли тиофосген (250 мкл, 3.1 ммоль). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 3 ч отделяли образовавшийся осадок фильтрованием на бумажном фильтре, фильтрат упаривали на ротационном испарителе, 2 раза соупаривали с 6 мл толуола при 45°C, затем упаривали реакционную смесь в течение 1 ч при 60°C для удаления избытка пиперидина. После высушивания в эксикаторе было получено 158 мг продукта в виде желто-оранжевого масла (выход 24%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ , м.д.): 1.54 (m, 12H,  $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 3.40 (m, 8H,  $\text{N}-\text{CH}_2-$ ).

***N,N'*-дигептил-*N,N'*-диметилтио-мочевина (IVb).** К раствору *N*-гептилбутиламина (550 мкл, 3.2 ммоль) в 6 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли *N*-диизопропилэтиламин (550 мкл, 3.2 ммоль) и тиофосген (125 мкл, 1.5 ммоль). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 4 ч реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии в системе 20%-ный этанол в толуоле с добавлением 1% триэтиламина. Объединенные фракции упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 180 мг продукта в виде желтого масла (выход 55%).

***N,N'*-дидодецил-*N,N'*-диметилтио-мочевина (Vb).** К раствору *N*-додецилметиламина (1630 мкл, 3.2 ммоль) в смеси 4 мл гексана и 2 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли тиофосген (125 мкл, 1.5 ммоль). Реакцию проводили при температуре 60°C. Через 20 ч реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии в дихлорметане с добавлением 1% триэтиламина. Объединенные фракции упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 333 мг продукта в виде желтых кристаллов (выход 49%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 0.87 (t, 6H,  $-\text{N}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$ ), 1.25 (m, 40H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$ ), 2.99 (s, 6H,  $\text{N}-\text{CH}_3$ ), 3.51 (t, 4H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$ ).

**Тетрагексилтио-мочевина (VIb).** К раствору тетрагексиламина (3 мл, 12.7 ммоль) в смеси 4 мл гексана и 2 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли тиофосген (250 мкл, 3.1 ммоль). Реакцию проводили при температуре 60°C. Через 20 ч реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии в системе 2%-ный этилацетат в гексане с добавлением 1% триэтиламина.

Объединенные фракции упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 637 мг продукта в виде желтых кристаллов (выход 50%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 0.87 (t, 12H,  $-\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$ ), 1.26 (m, 32H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$ ), 3.45 (t, 8H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$ ).

**Общая методика получения солей Вильсмайера и диаминокарбенийазидов (I, III–VI).** К раствору соответствующей тио-мочевины или мочевины в 6 мл ацетонитрила (или дихлорметана для тио-мочевин (Vb, VIb)) при перемешивании по каплям добавляли оксалихлорид (3 экв.). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 15 мин после завершения выделения газа добавляли твердый гексафторфосфат калия (1.1 экв.). Через 4 ч фильтровали реакционную смесь на бумажном фильтре, фильтрат упаривали на ротационном испарителе для удаления избытка оксалихлорида, растворяли в 6 мл ацетонитрила и при перемешивании добавляли твердый азид натрия (5 экв.). Через 20 ч реакционную смесь фильтровали на бумажном фильтре и упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе получали соответствующий азид в виде желтого или коричневого масла.

**Гексафторфосфат азидо-*N,N,N',N'*-тетраметилформамидиния (I).** Получено 172 мг продукта (выход 30%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 2.80 (s, 12H,  $-\text{CH}_3$ ).

**Гексафторфосфат азидодиперидинокарбения (III).** Получено 73 мг продукта (выход 48%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ , м.д.): 1.58 (m, 12H,  $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 3.25 (m, 8H,  $\text{N}-\text{CH}_2-$ ).

**Гексафторфосфат азидо-*N,N'*-дигептил-*N,N'*-диметилформамидиния (IV).** Получено 65 мг продукта (выход 24%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ , м.д.): 0.85 (t, 6H,  $\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$ ), 1.24 (m, 20H,  $\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5$ ), 2.85 (s, 6H,  $\text{N}-\text{CH}_3$ ), 3.07 (t, 4H,  $\text{N}-\text{CH}_2-$ ).

**Гексафторфосфат азидо-*N,N'*-дидодецил-*N,N'*-диметилформамидиния (V).** Получено 162 мг продукта (выход 36%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 0.87 (t, 6H,  $-\text{N}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$ ), 1.25 (m, 40H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$ ), 2.85 (s, 6H,  $\text{N}-\text{CH}_3$ ), 3.45 (t, 4H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$ ).

**Гексафторфосфат азидо-*N,N,N',N'*-тетрагексилформамидиния (VI).** Получено 337 мг продукта (выход 38%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 0.87 (t, 12H,  $-\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$ ), 1.26 (m, 32H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$ ), 3.35 (t, 8H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$ ).

**Гексафторфосфат азидодипирролидинокарбения (II).** К раствору гексафторфосфата хлоридипирролидинокарбения (350 мг, 1 ммоль) в 6 мл сухого ацетонитрила добавляли твердый азид на-

трия (260 мг, 5 ммоль). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 2 ч реакционную смесь фильтровали на бумажном фильтре, фильтрат упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 280 мг продукта в виде белых кристаллов (выход 82%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (80 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ , м.д.): 1.91 (m, 8H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.67 (m, 8H, N-CH<sub>2</sub>-).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была предложена синтетическая схема, позволяющая получать широкий набор тетразамещенных диаминокарбенилазидов из вторичных аминов. В случае использования коммерчески доступных мочевины или солей Вильсмайера схема синтеза может быть сокращена, однако в каталогах можно найти лишь ограниченное количество таких реагентов, тогда как широкий набор доступных вторичных аминов позволяет получать большое количество различных азидов.

С использованием данной схемы был синтезирован набор азидов-модификаторов, содержащих алкильные заместители различной длины, которые были использованы для введения модификаций в состав олигонуклеотидов по реакции Штаудингера. Было показано, что эффективность введения модификации падает с увеличением размера алкильных заместителей. Высокие значения конверсии в случае коммерческого азида ADMP, а также азида (II), полученного в одну стадию из соли Вильсмайера, свидетельствуют о существенном влиянии даже незначительного количества примесей в используемом азиде на эффективность протекания реакции.

Предварительное элиминирование цианэтильной группы в безводных условиях позволяет существенно увеличить эффективность введения модификации за счет превращения фосфазенового остатка в стабильный фосфорилгуанидин до финального деблокирования олигонуклеотида водным раствором аммиака.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Объединенному центру коллективного пользования Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН за проведение масс-спектрометрического анализа олигонуклеотидов и м.н.с. лаборатории биомедицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН А.С. Чубарову за регистрацию спектров ЯМР.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке базового бюджетного финансирования Программы фун-

даментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210024-8.

М.С. Купрюшкин выражает благодарность Российскому научному фонду (проект № 19-14-00204) за поддержку синтеза и характеристики нативных и модифицированных олигонуклеотидов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

М.С. Купрюшкин и Д.В. Пышный являются соучредителями ООО “НooГен” — компании, занимающейся разработкой технологии получения фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и их применения.

С.А. Жуков заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin W., Rogge M. // *Cts-Clin. Transl. Sci.* 2019. V. 12. P. 98–112. <https://doi.org/10.1111/cts.12624>
2. Heo Y.A. // *Drugs.* 2020. V. 80. P. 329–333. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01267-2>
3. Balwani M., Sardh E., Ventura P., Peiro P.A., Rees D.C., Stolzel U., Bissell D.M., Bonkovsky H.L., Windyga J., Anderso, K.E., Parker C., Silver S.M., Keel S.B., Wang J.D., Stein P.E., Harper P., Vassiliou D., Wang B., Phillips J., Ivanova A., Langendonk J.G., Kauppinen R., Minder E., Horie Y., Penz C., Chen J.H., Liu S.B., Ko J.J., Sweetser M.T., Garg P., Vaishnav A., Kim J.B., Simon A.R., Gouya L., Investigators E. // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382. P. 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913147>
4. Rinaldi C., Wood M.J.A. // *Nat. Rev. Neurol.* 2018. V. 14. P. 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>
5. Deleavey G.F., Damha M.J. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. P. 937–954. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.011>
6. Roy S., Caruthers M. // *Molecules.* 2013. V. 18. P. 14268–14284. <https://doi.org/10.3390/molecules18114268>
7. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. P. 116–118. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-116-118>
8. Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 709–718. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060153>
9. Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D. // *Patent WO2016028187A1*, 2016.

10. *Wieland G., Simchen G.* // *Liebigs Ann. Chem.* 1985. V. 1985. P. 2178–2193.  
<https://doi.org/10.1002/jlac.198519851108>
11. *Kitamura M., Murakami K.* // *Org. Synth.* 2015. V. 92. P. 171.  
<https://doi.org/10.15227/orgsyn.092.0171>
12. *El-Faham A.* // *Org Prep. Proced. Int.* 1998. V. 30. P. 477–481.  
<https://doi.org/10.1080/00304949809355316>
13. *Bazhenov M.A., Shernyukov A.V., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 699–708.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060074>

## Synthesis of Novel Representatives of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides

S. A. Zhukov\*, D. V. Pyshnyi\*, \*\*, and M. S. Kupryushkin\*.\*

#Phone: +7 (923) 243-26-23; e-mail: [kuprummax@gmail.com](mailto:kuprummax@gmail.com); [pyshnyi@niboch.nsc.ru](mailto:pyshnyi@niboch.nsc.ru)

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

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

In this work novel representatives of phosphoryl guanidine oligonucleotide derivatives were obtained. A synthetic scheme was proposed and implemented, suitable for preparation of a wide set of diaminocarbenium azides starting from different secondary amines, for subsequent incorporation of tetrasubstituted guanidine moieties into oligonucleotides by Staudinger reaction. A number of factors affecting the yields of phosphoryl guanidine derivatives were identified, such as size of alkyl substituents in the corresponding azide, purity of the azide, and carrying out elimination of protecting cyanoethyl group before final deblock of the oligonucleotide.

*Keywords: automated oligonucleotide synthesis, modified oligonucleotides, organic azides, Staudinger reaction, phosphoryl guanidines, phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO)*



УДК 577.113.4

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ КОНЬЮГАТОВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ siРНК С ГЕМОПОЭТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ *in vitro* И *in vivo*

© 2021 г. И. В. Черников\*, М. И. Мещанинова\*, Д. В. Гладких\*,  
А. Г. Веньяминава\*, М. А. Зенкова\*, В. В. Власов\*, Е. Л. Черноловская\*.#

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

Поступила в редакцию 24.08.2020 г.

После доработки 03.09.2020 г.

Принята к публикации 14.09.2020 г.

Доставка малых интерферирующих РНК (siРНК) в клетки крови является одной из наиболее сложных задач, поскольку эффективные и нетоксичные способы доставки нуклеиновых кислот в эти клетки *in vivo* отсутствуют. Конъюгирование siРНК с адресными или липофильными молекулами-доставщиками является одним из наиболее перспективных подходов к решению этой задачи, поскольку может обеспечивать эффективное накопление siРНК без побочных токсических эффектов. В данной работе мы конъюгировали siРНК с липофильными молекулами для ее доставки в первичные мононуклеарные клетки крови (РВМС) и клетки цельной крови. Мы показали, что среди исследованных липофильных молекул холестерин является наиболее перспективным агентом для этой цели. Дальнейший скрининг конъюгатов по длине линкера, соединяющего siРНК и холестерин, показал, что линкер, содержащий 6 атомов углерода, является оптимальным для эффективной доставки siРНК в клетки человека в составе цельной крови. Выбранный холестериновый конъюгат siРНК также эффективно накапливался в клетках крови и спленоцитах мыши после внутривенной инъекции.

**Ключевые слова:** siРНК, химические модификации, липофильные конъюгаты, гемопоэтические клетки, доставка в клетки

**DOI:** 10.31857/S013234232102007X

### ВВЕДЕНИЕ

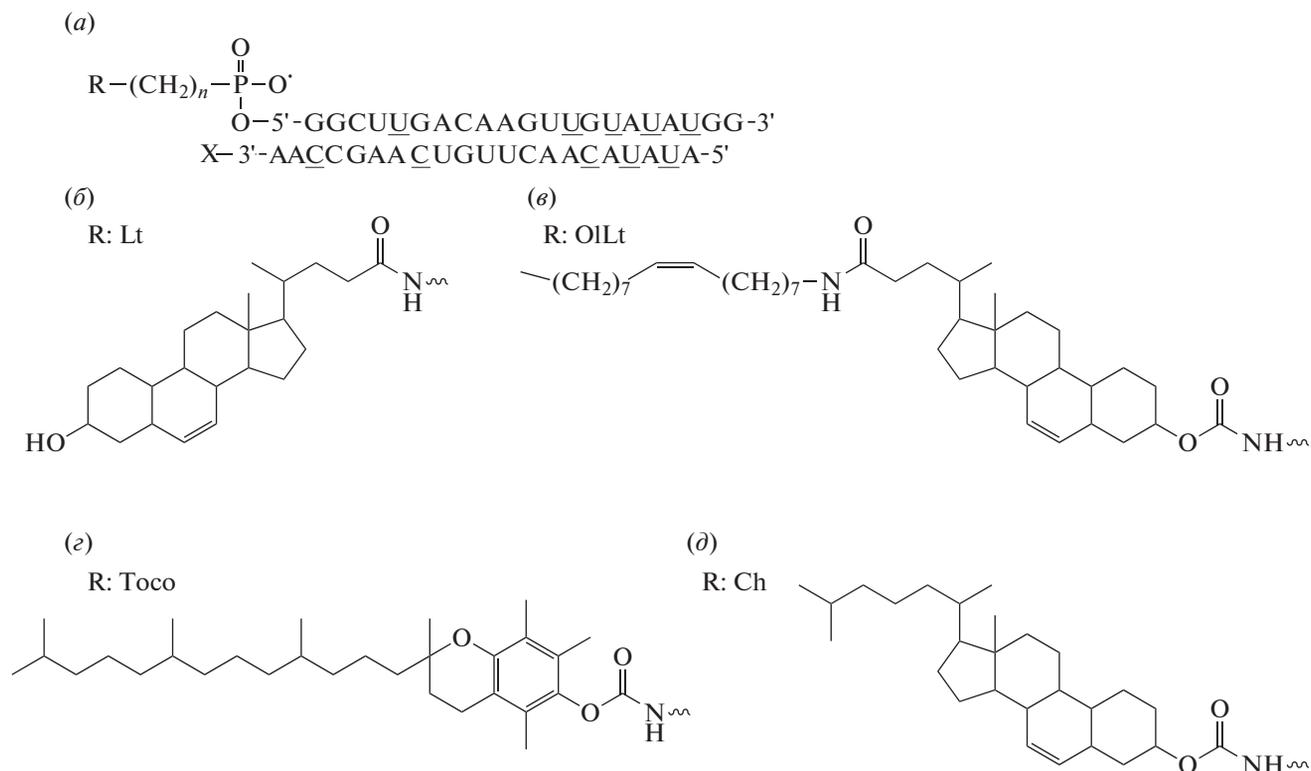
Создание препаратов на основе малых интерферирующих РНК (siРНК) является перспективным подходом к лечению заболеваний, связанных с нарушением экспрессии определенных генов, которые не поддаются лечению стандартными методами. Однако доставка siРНК в клетки-мишени *in vitro* и особенно *in vivo* остается в настоящее время сложной и актуальной задачей, решение которой необходимо для внедрения результатов биомедицинских исследований в клиническую практику [1]. Введение остатков молекул природного происхождения в состав siРНК путем их прямого конъюгирования с siРНК на сегодняшний день является наиболее перспективной техноло-

гией доставки, поскольку, в отличие от других подходов (вирусные векторы, доставка с помощью катионных липидов и полимеров), преимуществами использования биоконъюгатов являются специфичность и эффективность их проникновения в клетки-мишени при отсутствии токсических эффектов [2–5]. Гемопоэтические клетки считаются наиболее сложными для доставки в них siРНК, при этом разработка систем доставки siРНК в данные клетки крайне необходима для совершенствования методов антиретровирусной терапии и повышения эффективности лечения опухолевых заболеваний крови [6, 7]. Поэтому оценка возможности использования биоконъюгатов для доставки siРНК в гемопоэтические клетки является актуальной.

В данной работе было исследовано взаимодействие липофильных производных siРНК с клетками крови *in vitro* и *in vivo* и показано, что из всех исследованных липофильных молекул именно присоединение холестерина к siРНК способствует наиболее эффективному накоплению siРНК

Сокращения: А – Alexa Fluor-488; Ch – холестерин; F – флуоресцеин; Lf – Липофектамин; Lt – литохоловая кислота; OILt – олеиламид литохоловой кислоты; РВМС – первичные мононуклеарные клетки крови (primary blood mononuclear cells); siРНК – малая интерферирующая РНК (small interfering RNA, siRNA); Тосо –  $\alpha$ -токоферол.

# Автор для связи: (эл. почта: elena\_ch@niboch.nsc.ru).



**Рис. 1.** (а) – Структура липофильных производных siРНК, где U и C – 2'-*O*-метильные аналоги U и C соответственно; R – остатки липофильных молекул, введенные с 5'-конца смысловой цепи; *n* (3, 6, 8, 10 или 12) – число метиленовых звеньев в алифатическом линкере, связывающем siРНК и липофильную молекулу; X – флуоресцеин (F) или Alexa Fluor-488; структуры остатков литохолоевой кислоты (Lt) (б), олеиламида литохолоевой кислоты (OILt) (в),  $\alpha$ -токоферола (Тосо) (г) и холестерина (Ch) (д).

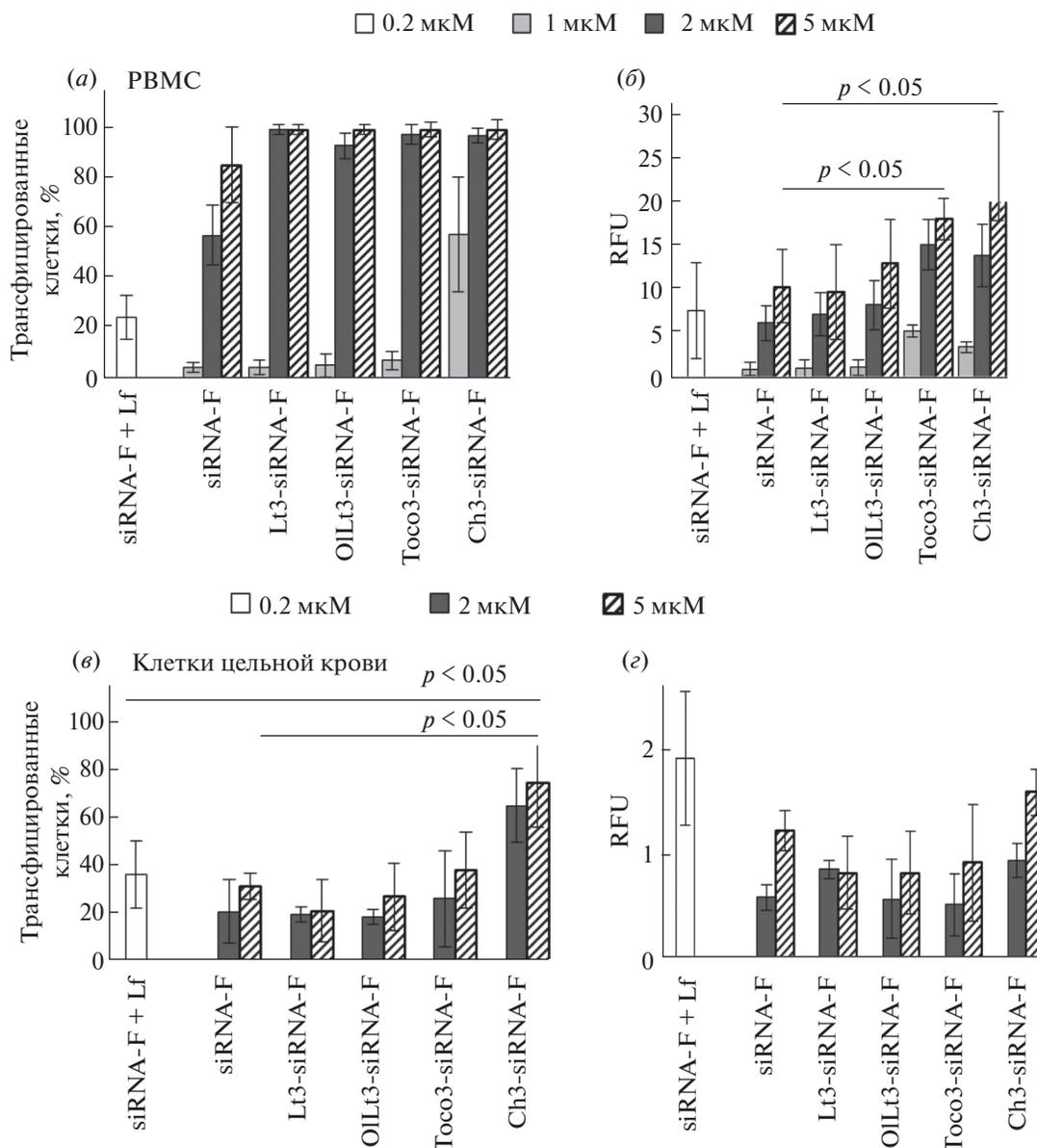
в клетках крови. Поскольку ранее мы показали, что длина линкера в составе холестеринного конъюгата siРНК является фактором, определяющим эффективность взаимодействия конъюгатов с культивируемыми линиями клеток [8–10], мы исследовали влияние длины линкера на накопление холестеринных конъюгатов siРНК в клетках крови и показали, что холестеринный конъюгат с оптимизированной длиной линкера эффективно накапливается в клетках крови *in vitro* и *in vivo*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Природа липофильной молекулы определяет эффективность накопления конъюгатов siРНК в гемопоэтических клетках человека.** Ранее нами был разработан алгоритм селективной модификации siРНК, который включает в себя защиту нуклеазочувствительных сайтов (UpG, UpA и CpA) путем введения 2'-*O*-метильных аналогов рибонуклеотидов с 3'-стороны от легко расщепляемой связи [11]. Было показано, что siРНК, направленная на мРНК гена *MDR1* и содержащая 2'-*O*-метильные звенья в нуклеазочувствительных сайтах, способна эффективно ингибировать экспрессию данного гена в клетках человека KB-8-5 при транс-

фекции с помощью Липофектамина [12–14]. Для исследования влияния природы липофильной молекулы на эффективность накопления таких siРНК в гемопоэтических клетках человека siРНК конъюгировали с холестерином,  $\alpha$ -токоферолом, литохолоевой кислотой и олеиламидом литохолоевой кислоты. Липофильные производные были присоединены к 5'-концу олигорибонуклеотида через олигометиленовые линкеры различной длины с использованием удобного твердофазного подхода, предложенного нами ранее [8] (рис. 1). Alexa Fluor-488- (А) или флуоресцеин-меченые (F) конъюгаты siРНК, содержащие липофильную молекулу, добавляли к выделенным первичным мононуклеарным клеткам крови (РВМС) человека (1–5 мкМ) и оценивали эффективность накопления конъюгатов методом проточной цитофлуориметрии.

Трансфекцию неконъюгированной siРНК проводили при помощи Липофектамина в концентрации 0.2 мкМ для того, чтобы сохранить рекомендуемое производителем соотношение количества Липофектамина и siРНК с целью эффективного образования комплексов, поскольку более высокая концентрация Липофектамина была бы токсич-

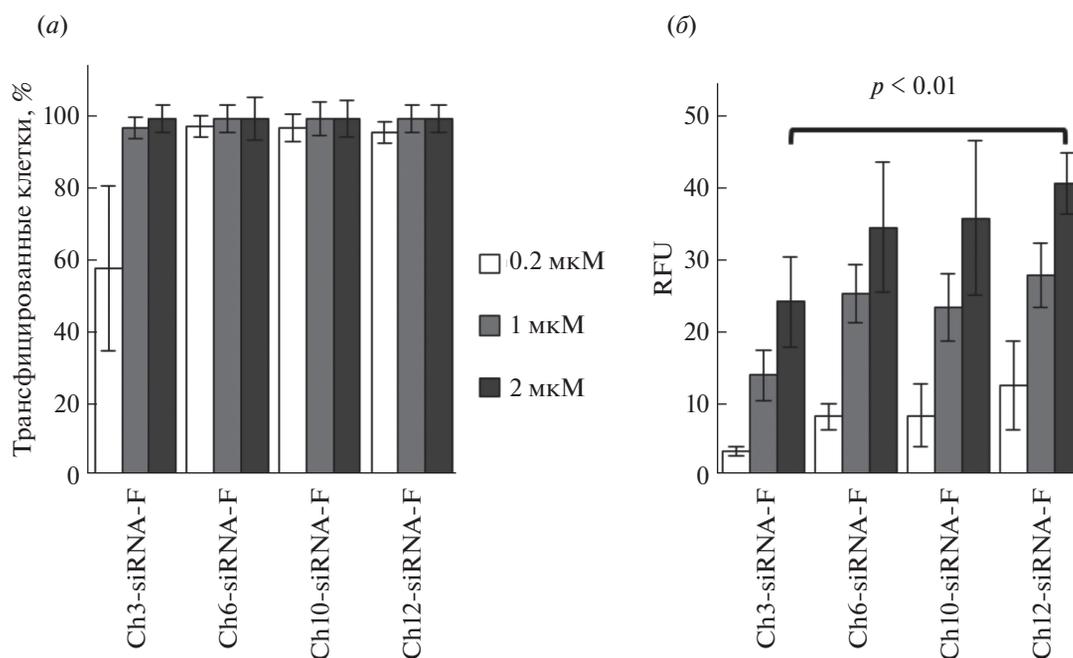


**Рис. 2.** Накопление флуоресцентно-меченых аналогов липофильных производных siРНК с линкером из трех метиленовых звеньев в РВМС (а, б) и клетках цельной крови человека (е, з). Приведены доля трансфицированных клеток (а, е) и средние значения флуоресценции популяции клеток (б, з). Представлены средние значения ( $\pm$  SD), рассчитанные по результатам трех независимых экспериментов, и статистическая значимость ( $p$ ).

на для клеток. Время инкубации siРНК с клетками (4 ч) было выбрано исходя из ранее полученных нами данных [8, 15]. Показано, что доля клеток, трансфицированных липофильными конъюгатами siРНК в концентрации 2 и 5 мкМ, была выше как по сравнению с неконъюгированной siРНК в свободном виде, так и с siРНК, доставляемой при помощи Липофектамина (рис. 2а). При концентрации 1 мкМ наибольшая эффективность трансфекции была достигнута при использовании конъюгата siРНК и холестерина (58%) (рис. 2а), для остальных типов исследованных конъюгатов доля трансфицированных клеток варьировала от 5 до 7.5%. При

этом эффективность накопления липофильных производных siРНК в клетках РВМС, выраженная в относительных единицах флуоресценции (RFU), увеличивалась в зависимости от типа липофильной молекулы в ряду: литохоловая кислота < олеиламид литохоловой кислоты < токоферол < холестерин и при концентрации конъюгатов 5 мкМ составляла, соответственно, 10, 13, 18 и 24 RFU (рис. 2б).

Для того чтобы оценить влияние сыворотки и электролитов плазмы на накопление липофильных конъюгатов в клетках крови, проводили их



**Рис. 3.** Накопление флуоресцентно-меченых холестеринных производных siРНК, содержащих линкеры различной длины (3–12 метиленовых звеньев), в РВМС. Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии, в каждом образце анализировали 10000 клеток. Приведены средние значения ( $\pm$  SD), рассчитанные по результатам трех независимых экспериментов, и статистическая значимость ( $p$ ).

инкубацию с цельной кровью человека в присутствии антикоагулянта. Показано, что эффективность накопления конъюгатов зависит от типа липофильной молекулы и также увеличивается в ряду: литохолевая кислота < олеиламид литохолевой кислоты < токоферол < холестерин, доля трансфицированных клеток при концентрации конъюгатов 5 мкМ составила 21, 27, 38 и 74% соответственно (рис. 2а). Оценка уровня средней интенсивности флуоресценции трансфицированных клеток показала, что данное значение для неконъюгированной siРНК, доставляемой при помощи Липофектамина, было выше, чем у клеток, инкубированных с конъюгатами (рис. 2б). Из полученных нами данных видно, что взаимодействие с клетками в составе цельной крови происходит менее эффективно, чем с теми же клетками, находящимися в культуральной среде, поэтому подбор оптимальных средств доставки для этого типа клеток-мишеней особенно важен.

**Длина линкера в составе холестеринных производных siРНК влияет на их накопление в гемопоэтических клетках.** Ранее нами было установлено, что структура линкера в составе холестеринных производных siРНК, в частности его длина, влияет на эффективность накопления конъюгатов в культивируемых клетках и, как следствие, определяет биологическую активность siРНК [8, 9]. Поэтому мы исследовали влияние данного фактора на эффективность накопления конъюгатов в

РВМС и клетках цельной крови человека. Для этого конъюгаты добавляли к клеткам до конечной концентрации 0.2–2.0 мкМ. В ходе работы нами показано, что все исследованные холестеринные конъюгаты эффективно накапливались в клетках: уже при концентрации 1 мкМ эффективность трансфекции достигала 100% (рис. 3а). При анализе среднего уровня интенсивности флуоресценции показано, что при удлинении линкера между siРНК и холестерином наблюдается плавное увеличение накопления холестеринных конъюгатов: эффективность накопления составляла 24, 35, 36 и 41 RFU для конъюгатов с линкером из 3, 6, 10 и 12 метиленовых звеньев соответственно. Однако статистически достоверными являются только отличия в эффективности накопления между конъюгатами, содержащими 3 и 12 метиленовых звеньев ( $p < 0.01$  при сравнении Ch3-siRNA-F с Ch12-siRNA-F, рис. 3б).

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в нашей лаборатории ранее [8–10]. Липофильная природа холестерина позволяет предположить, что механизм проникновения холестеринных производных siРНК в клетки на первом этапе включает “заякоривание” конъюгатов в мембране [16], поэтому увеличение длины линкера может облегчать этот процесс за счет увеличения расстояния между отрицательно заряженной siРНК и остатком холестерина.

Для того чтобы оценить влияние сыворотки и электролитов плазмы на накопление холестерин-производных siРНК в клетках крови, проводили инкубацию конъюгатов с цельной кровью человека. Показано, что доля трансфицированных клеток после их инкубации в течение 4 ч с 5 мкМ холестерин-содержащими siРНК составила 70–80%, что превышает это значение для неконъюгированной siРНК (62%), а также превышает долю клеток, трансфицированных неконъюгированной siРНК при помощи Липофектамина (44%) (рис. 4а). Анализ средней интенсивности флуоресценции клеток показал, что накопление холестерин-конъюгатов зависит от длины линкера, соединяющего холестерин с siРНК (рис. 4б). При этом конъюгат с линкером из 8 метиленовых звеньев показал наиболее эффективное накопление в клетках крови, значение RFU составило 4.95, что превышает значение RFU для других исследованных производных siРНК (2.44–4.21 RFU). Неконъюгированная siРНК накапливалась с наименьшей эффективностью (1.86 RFU, это значение только в 5 раз выше уровня автофлуоресценции контрольных клеток).

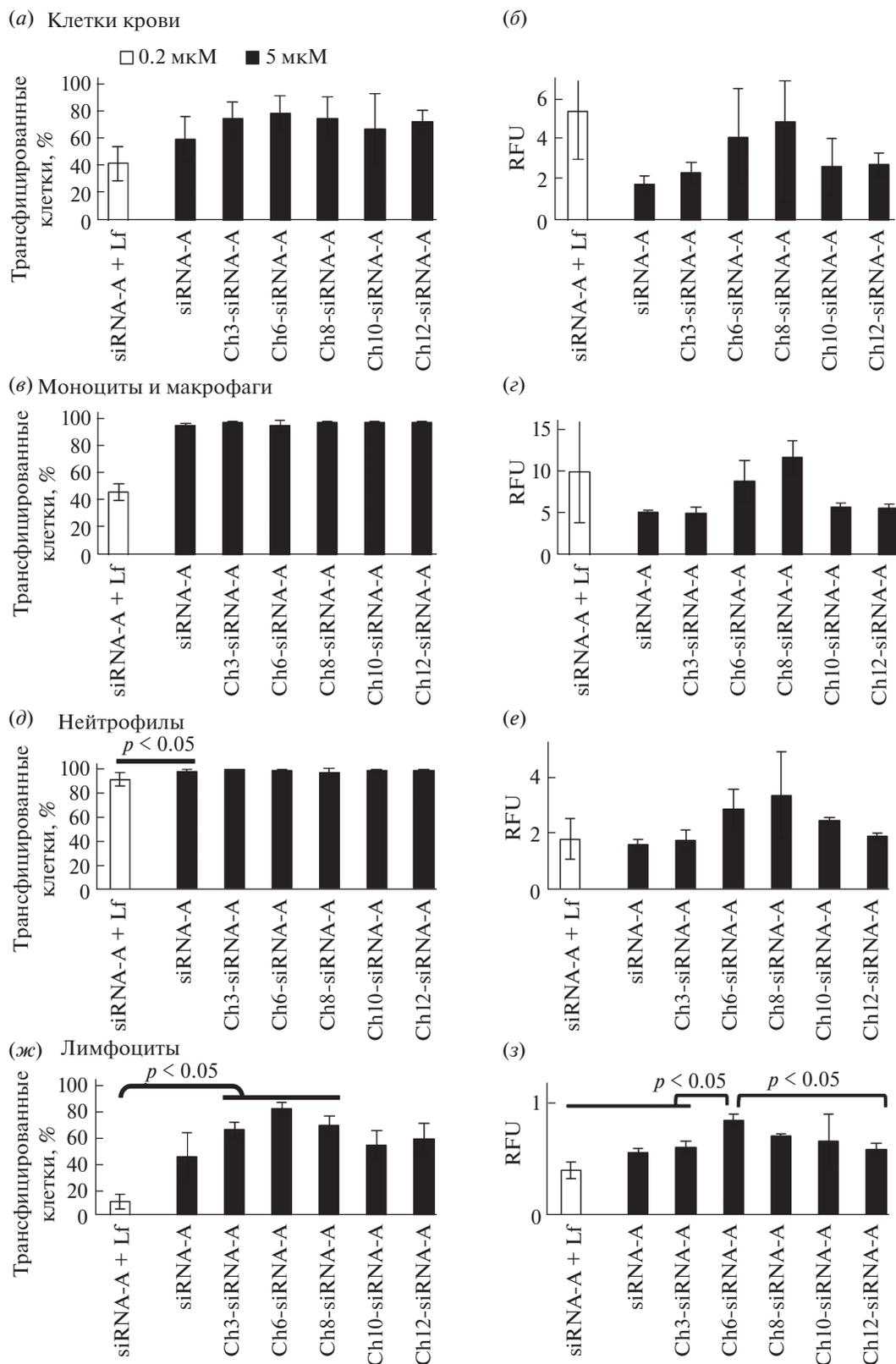
Поскольку количество siРНК, доставленной в клетки при помощи Липофектамина, оцениваемое по средней интенсивности флуоресценции клеток, сопоставимо с количеством Ch8-siRNA-A, доставленной в клетки без помощи носителя (5.5 и 4.95 RFU соответственно), а доля трансфицированных клеток в случае Ch8-siRNA-A превышает таковое значение для siРНК, доставляемой Липофектаминам (77 и 44% соответственно), возник вопрос о том, в каких типах клеток крови происходит наиболее эффективное накопление siРНК при доставке в составе конъюгата с холестерином или при помощи Липофектамина. Для разделения лейкоцитов крови на индивидуальные популяции клеток (лимфоциты, нейтрофилы, моноциты и макрофаги) использовали соответствующие антигены с флуоресцентными метками. Данные показали, что накопление siРНК для обоих способов доставки (Липофектамин или конъюгация с холестерином) уменьшается в ряду: моноциты и макрофаги > нейтрофилы > лимфоциты (рис. 4). Наиболее эффективное накопление во всех популяциях наблюдается при использовании холестерин-конъюгатов siРНК, при этом в нейтрофилах, моноцитах и макрофагах эффективнее всего накапливается Ch8-siRNA-A (рис. 4в–е), а в лимфоцитах – Ch6-siRNA-A (рис. 4ж, 4з). Наименьшая эффективность накопления siРНК во всех популяциях клеток наблюдается при использовании Липофектамина. Однако следует отметить, что siРНК, доставляемая при помощи Липофектамина, была использована в концентрации 0.2 мкМ из-за ограничений, накладываемых токсичностью трансфекционного агента. Доля трансфицированных клеток во всех популяциях по-

сле инкубации с неконъюгированной siРНК в свободном виде (5 мкМ) была выше, чем при ее доставке Липофектаминам (0.2 мкМ) (рис. 4в, 4д, 4ж).

Таким образом, оптимальным способом доставки siРНК в моноциты, макрофаги и нейтрофилы является конъюгирование siРНК с холестерином при использовании линкера, содержащего 8 метиленовых звеньев, а для доставки в лимфоциты – линкера с 6 метиленовыми звеньями. Вероятно, в условиях цельной крови из-за наличия компонентов сыворотки конъюгаты с более длинными линкерами (10 и 12 метиленовых звеньев) за счет большей гидрофобности эффективнее взаимодействовали с компонентами сыворотки, а не с клетками крови. Нельзя исключить, что комплексы siРНК с Липофектаминам, которые имеют положительный заряд и размеры 150–200 нм, могут захватываться клетками, обладающими фагоцитарной активностью, такими как нейтрофилы, моноциты и макрофаги, что обеспечивает их эффективное накопление именно в этих клетках (рис. 4в–е).

**Присоединение холестерина к siРНК значительно изменяет динамику концентрации siРНК в крови мышей после внутривенного введения.** Определение динамики изменения концентрации siРНК и ее холестерин-производного в крови здоровых животных проводили на мышах линии C57BL/6. Показано, что уже в первой экспериментальной точке – через 5 мин после введения – концентрация препаратов в крови животных значительно отличается: концентрация холестерин-содержащего конъюгата Ch6-siRNA на 3 порядка превышает концентрацию неконъюгированной siРНК. В течение первого часа после введения концентрация Ch6-siRNA падает примерно в 10 раз по сравнению с первой экспериментальной точкой (рис. 5) и примерно на 3 порядка уменьшается через 24 ч после введения. Следует отметить, что siРНК без холестерина значительно быстрее выводится из крови и циркулирует в ней в значительно меньших концентрациях, чем ее холестерин-содержащий аналог, хотя после 1 часа динамика изменения концентрации сильно замедляется, и далее концентрация препарата в крови снижается медленно. Такая динамика, вероятнее всего, является следствием того, что через 3 ч после инъекции концентрация siРНК подходит к порогу чувствительности метода Stem-loop ПЦР, поскольку нет оснований полагать, что siРНК несколько часов находится в плазме крови без изменения концентрации (рис. 5). Нельзя исключить и того, что равновесие между свободной и связанной с клетками siРНК вносит вклад в сохранение ее ненулевого уровня в плазме крови через 24 ч.

Значительная разница в скорости выведения препарата в первые минуты после введения, скорее всего, связана с тем, что молекулярный вес



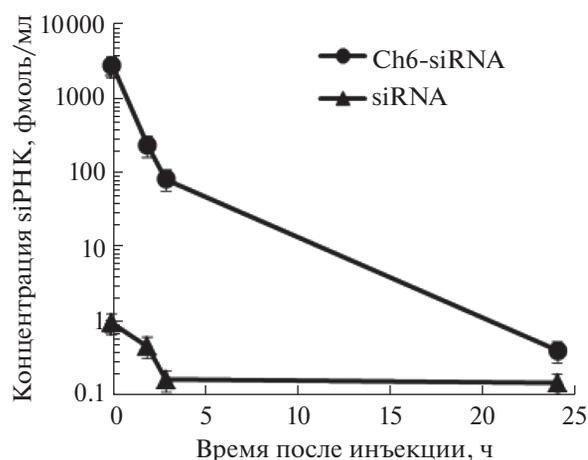
**Рис. 4.** Накопление Alexa Fluor-488-меченых холестеринных производных siРНК, содержащих линкеры различной длины (3–12 метиленовых звеньев), в клетках в составе цельной крови здорового донора. Приведены доля трансфицированных клеток (а, в, д, ж) и средняя интенсивность флуоресценции (RFU) (б, г, е, з) после инкубации цельной крови донора с соответствующими siРНК: всех клеток после лизиса эритроцитов (а, б), моноцитов и макрофагов (в, г), нейтрофилов (д, е) и лимфоцитов (ж, з). Исследования проводили при помощи проточной цитофлуорометрии, в каждом образце анализировали 10000 клеток. Средние значения ( $\pm$  SD) рассчитаны по результатам трех независимых экспериментов.

siРНК ниже критического лимита фильтрации соединений почками, и она быстро выводится из кровотока. В то же время было показано [17], что конъюгат асимметричной siРНК, содержащий чередующиеся 2'-O-Me- и 2'-F-модификации, фосфотиоатные звенья (PS) по концам дуплекса и холестерин с 3'-конца смысловой цепи, образуют в крови комплексы с липопротеинами, при этом молекулярная масса таких комплексов позволяет находящейся в них siРНК избежать выведения путем фильтрации. Можно предположить, что и в случае исследованного нами конъюгата увеличение времени его циркуляции в кровотоке происходит по сходному механизму.

**Холестериновые производные siРНК накапливаются в клетках крови и в спленоцитах *in vivo*.** Исследование накопления Alexa Fluor-488-меченых Ch6-siRNA-A и siRNA-A в клетках крови проводили на мышах линии C57BL/6 после внутривенной инъекции 1.7 или 9 мкг/г siРНК или ее холестеринного конъюгата. Через 30 мин, 1 и 4 ч после инъекции у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса, индивидуальные популяции клеток окрашивали соответствующими антителами с флуоресцентными метками и лизировали эритроциты; эффективность накопления оценивали методом проточной цитофлуорометрии.

Показано, что присоединение холестерина к siРНК существенно увеличивает ее способность связываться с клетками крови (рис. 6а–з), при этом эффективность трансфекции моноцитов/макрофагов и нейтрофилов достигает 80–90% (рис. 6в, 6д). Уже через 30 мин после введения Ch6-siRNA-A клетки показывают значительный уровень флуоресценции, однако кинетика накопления для разных типов клеток отличается: максимальное накопление в нейтрофилах было зафиксировано через 30 мин после введения (94%, 1.4 RFU) и затем, через 4 ч, эффективность накопления и количество трансфицированных клеток постепенно снижались (75%, 0.9 RFU, рис. 6в, 6з). Уровень накопления Ch6-siRNA-A в моноцитах и макрофагах, напротив, увеличивался со временем: с 75 до 86% и с 1.6 до 3.2 RFU в период от 30 мин до 4 ч соответственно (рис. 6д, 6е). Интенсивность флуоресценции Ch6-siRNA-A в лимфоцитах была всего в 2 раза выше, чем в контрольных клетках (0.5 RFU, рис. 6ж, 6з). siРНК без холестерина накапливалась в незначительном количестве только в моноцитах и макрофагах (25%, 0.5 RFU, рис. 6в, 6з).

Учитывая общее количество крови мыши, доза 9 мкг/г Ch6-siRNA-A примерно соответствует концентрации 8.5 мкМ. При этом эффективность накопления в Ch6-siRNA-A в цельной крови человека при концентрации 5 мкМ в 4 раза больше (рис. 4), чем эффективность накопления Ch6-siRNA-A в клетках крови мыши при дозе 9 мкг/г (4.2 и 1.1 RFU соответственно). Различная эффектив-

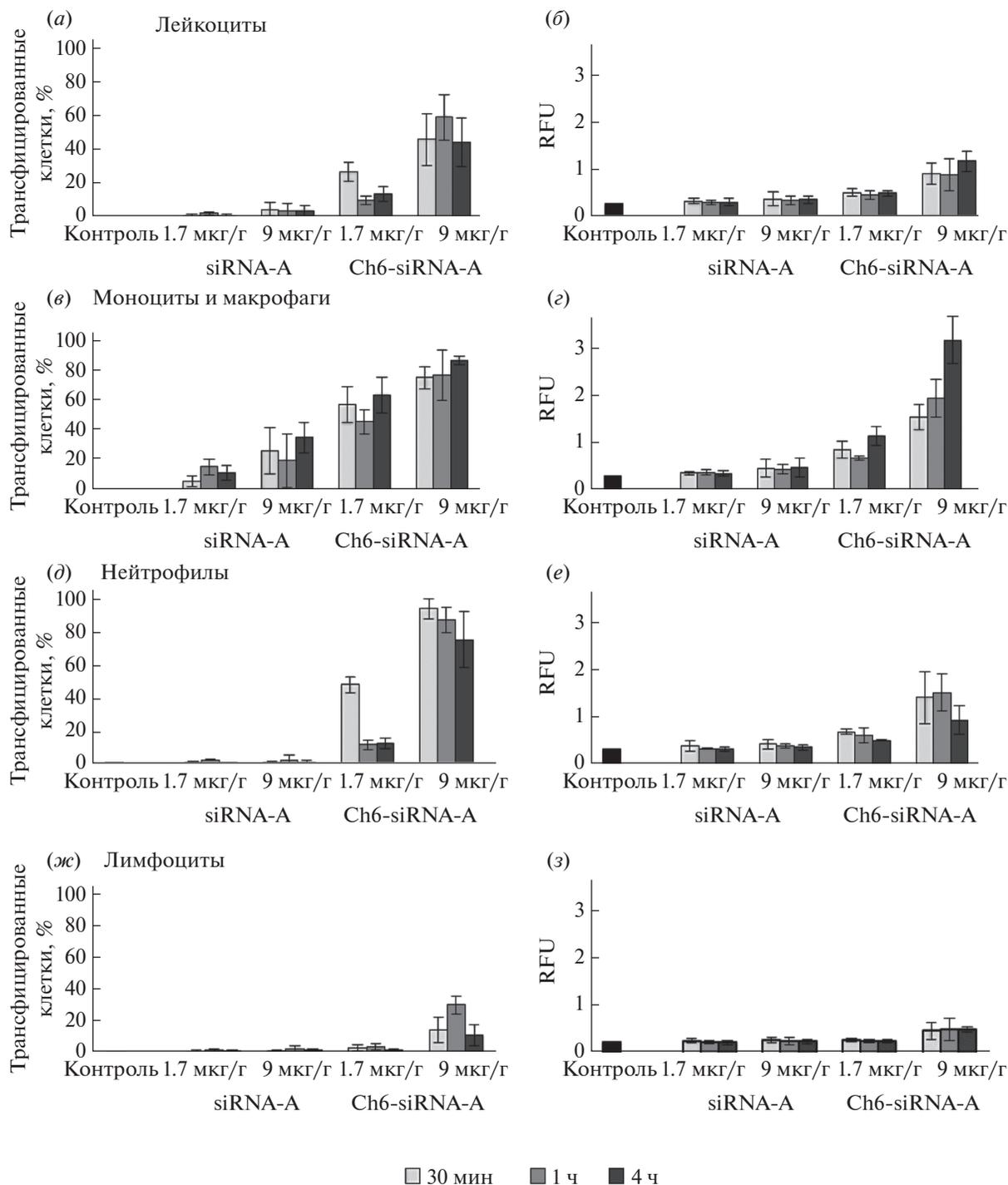


**Рис. 5.** Динамика изменения концентрации siРНК и ее конъюгата с холестерином, содержащего линкер из шести метиленовых звеньев (Ch6-siRNA), в плазме крови мышей C57BL/6 после внутривенной инъекции (0.5 мкг/г).

ность накопления Ch6-siRNA-A в клетках крови человека в пробирке и клетках крови мышей *in vivo* может объясняться меньшими размерами клеток крови мыши по сравнению с клетками крови человека, а также тем фактом, что *in vivo* Ch6-siRNA-A выводится из кровотока мыши путем фильтрации почками, элиминируется фагоцитарной системой животного (нейтрофилы, макрофаги и моноциты) или депонируется в различных органах и тканях (печень, селезенка и др.). В то же время в экспериментах на цельной крови человека концентрация конъюгата в процессе инкубации остается постоянной, что приводит к более высокой эффективности его накопления в клетках. Этот факт подчеркивает важность стабилизации препарата в кровотоке и обеспечения его достаточно высокой концентрации в течение длительного времени для эффективного накопления в клетках.

Моноциты и макрофаги обладают фагоцитарной активностью, за счет которой в них происходит постепенное накопление холестерин-содержащей siРНК, возможно, в составе комплексов с липопротеинами (рис. 6д, 6е). Снижение эффективности накопления Ch6-siRNA-A в нейтрофилах происходит, вероятно, из-за их миграции из кровотока в органы и ткани животного [18] и постепенного снижения концентрации Ch6-siRNA в крови (рис. 5).

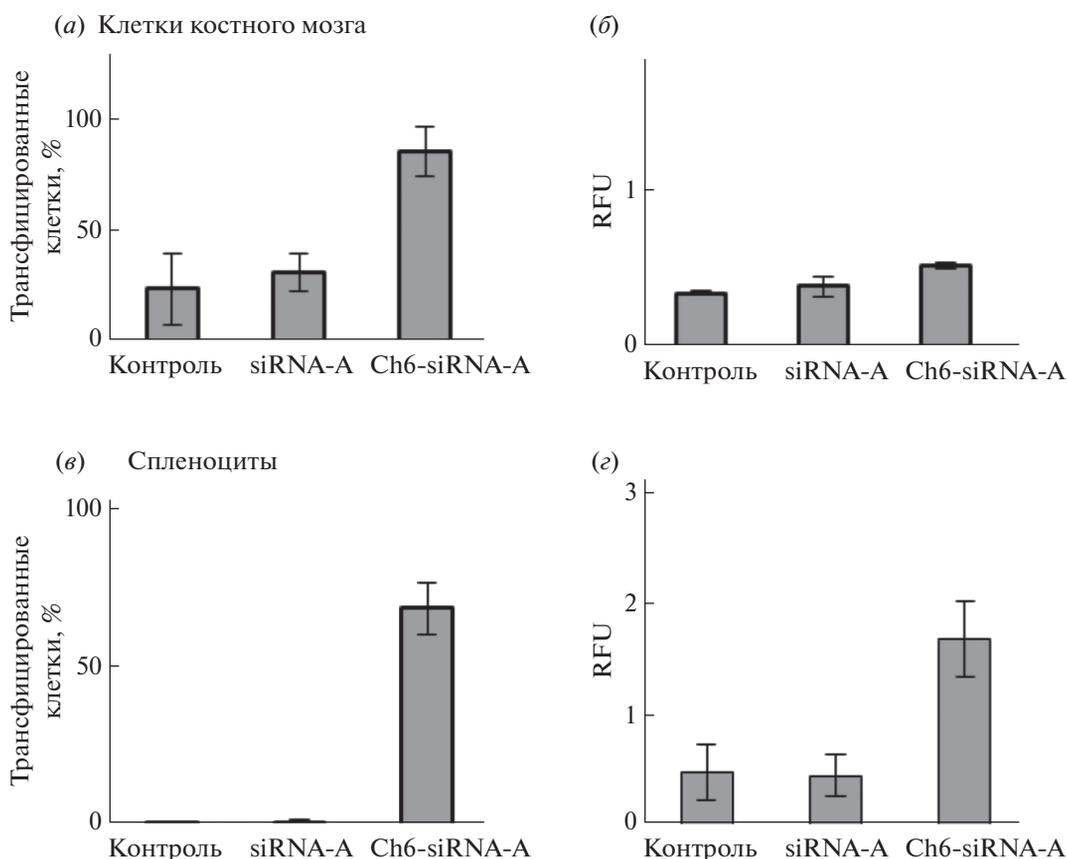
Изучение накопления холестерин-содержащей siРНК в костном мозге и спленоцитах мыши проводили через 6 ч после внутривенной инъекции методом проточной цитофлуорометрии. Показано, что присоединение холестерина существенно не улучшает эффективность проникновения siРНК в клетки костного мозга (рис. 7а,



**Рис. 6.** Накопление флуоресцентно-меченой siРНК и ее конъюгата с холестерином в клетках крови мыши после внутривенного введения. Приведены доля Alexa Fluor-488-позитивных клеток (%) (а, в, д, ж) и интенсивность флуоресценции популяции клеток в RFU (б, г, е, з): в суммарной фракции лейкоцитов (а, б), моноцитов и макрофагов (в, г), нейтрофилах (д, е), лимфоцитах (ж, з) через 30 мин, 1 и 4 ч после внутривенной инъекции 1.7 или 9 мкг/г siRNA и Ch6-siRNA-A. Средние значения ( $\pm$  SD) рассчитаны по результатам трех независимых экспериментов, в качестве контроля использована автофлуоресценция необработанных клеток.

7б), однако способствует увеличению накопления Ch6-siRNA-A в спленocyтах мыши по сравнению с siRNA-A, при этом эффективность трансфекции составляет 70 и 2%, а интенсивность флуоресцен-

ции – 1.65 и 0.45 RFU для Ch6-siRNA-A и siRNA-A соответственно (рис. 7в, 7г). Следует отметить, что увеличение накопления Ch6-siRNA-A в селезенке может быть следствием не только способно-



**Рис. 7.** Накопление флуоресцентно-меченой siРНК и ее конъюгата с холестерином в клетках костного мозга (а, б) и спленocyтaх (в, г) мыши через 6 ч после внутривенной инъекции (9 мкг/г). Приведены доля Alexa Fluor-488-позитивных клеток (%) (а, в) и интенсивность флуоресценции популяции клеток в RFU (б, г). Средние значения ( $\pm$  SD) рассчитаны по результатам трех независимых экспериментов, в качестве контроля использована автофлуоресценция не-обработанных клеток.

сти Ch6-siRNA-A накапливаться в спленocyтaх, но и результатом присутствия клеток крови в селезенке (нейтрофилов, моноцитов и макрофагов).

Применение препаратов на основе siРНК при гемобластозах является особенно актуальной проблемой из-за невозможности хирургического удаления данного вида опухоли. Для доставки siРНК в гемопоэтические клетки в экспериментальных условиях в основном используют катионные липиды и полимеры, которые не обеспечивают достаточную эффективность *in vivo* и зачастую проявляют токсическое действие [6].

Способность холестерина [19],  $\alpha$ -токоферола [20], аптамеров [21], антител [22] и пептидов, способных проникать в клетку [23, 24], изменять биодоступность и биораспределение siРНК была продемонстрирована в ряде работ; тем не менее эффективность биологического действия конъюгатов разного строения в разных типах клеток существенно различается, поэтому оптимизация состава и структуры этих конъюгатов является одной из наиболее актуальных задач при конструировании ингибиторов на основе siРНК. К насто-

ящему времени довольно подробно исследовано взаимодействие siРНК и их модифицированных аналогов с культивируемыми клеточными линиями различного происхождения, имеются данные о накоплении siРНК в органах и тканях животных при внутривенном введении свободной нуклеиновой кислоты или ее комплексов с различными носителями (см., например, обзор Khatri et al. [25]), однако взаимодействию siРНК и других терапевтических нуклеиновых кислот с клетками крови до сих пор не уделялось должного внимания. В качестве альтернативного способа доставки группой исследователей Nechaev et al. было предложено конъюгировать субстрат Дайсера (DsiРНК) с CpG-содержащим олигодезоксирибонуклеотидом, обеспечивающим выход DsiРНК из эндосом в цитоплазму клетки [26]. Конъюгирование с CpG-содержащими олигодезоксирибонуклеотидами приводит к повышению накопления DsiРНК в клетках, экспрессирующих рецептор TLR9, который специфически распознает и связывает данный CpG-мотив, при этом в других типах клеток наблюдается лишь небольшое неспецифическое

накопление такого конъюгата [26]. Таким образом, из-за повышенной экспрессии рецептора TLR9 конъюгат DsiРНК и CpG эффективно накапливается в таких клетках крови, как В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги [27]. Однако, в отличие от холестерина-содержащей siРНК, введение CpG-олигонуклеотидов *in vivo* приводит к активации систем врожденного иммунитета и продукции цитокинов и интерферонов, поэтому их применение ограничено.

Ранее мы показали, что Ch6-siRNA способна эффективно подавлять экспрессию гена-мишени и восстанавливать чувствительность опухолевых клеток к цитостатикам [8], однако механизм накопления Ch6-siRNA в гемопоэтических клетках значительно отличается от накопления в клетках карциномы [15], поэтому, несмотря на то что Ch6-siRNA эффективно накапливается в клетках крови, она не обеспечивает терапевтически значимого биологического действия при исследуемых концентрациях, поэтому дальнейшие разработки, направленные на увеличение эффективности накопления и биологической активности Ch6-siRNA в клетках крови, являются важным направлением исследований.

Таким образом, в данной работе показано, что природа липофильной молекулы и длина линкера в составе липофильных производных siРНК определяют эффективность накопления конъюгатов siРНК в гемопоэтических клетках человека. Наиболее эффективным способом доставки siРНК в моноциты, макрофаги и нейтрофилы является ее доставка в виде конъюгата с холестерином, присоединенного к 5'-концу смысловой цепи при помощи линкера из 8 метиленовых звеньев; для доставки siРНК в лимфоциты оптимальным является аналогичный конъюгат с линкером из 6 метиленовых звеньев. Следует отметить, что присоединение холестерина к siРНК значительно изменяет динамику концентрации siРНК в крови мышей после внутривенного введения, увеличивая время ее циркуляции и замедляя выведение, что является важным для обеспечения эффективного накопления siРНК в клетках и тканях.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение siРНК и конъюгатов.** Смысловые и антисмысловые цепи siРНК были синтезированы фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия). Для синтеза антисмысловых цепей siРНК, содержащих 3'-аминогексильный линкер (амиолинкер С6), использовали 3'-PT-amino-modifier С6 CPG (GlenResearch, США). Введение липофильных остатков на 5'-конец проводили Н-фосфонатным методом, используя полимер-связанный олигонуклеотид и Н-фосфонаты липофильных соединений [8]. Выделение и характеризацию продуктов

проводили с использованием ПААГ-электрофореза и масс-спектрометрии (LC-ESI-MS и MALDI-TOF-MS).

Присоединение флуоресцеина на 3'-конец антисмысловой цепи проводили в реакционной смеси объемом 150 мкл по аналогии с работой Proudnikov et al. [28]. К 30 мкл 0.9 мМ водного раствора антисмысловой цепи siРНК с амиолинкером С6 на 3'-конец добавляли 7.5 мкл триэтиламина, 97.5 мкл свежеперегнанного ДМСО и 15 мкл свежеприготовленного 0.3 М FITC I (Sigma-Aldrich, США) в ДМСО, после чего смесь инкубировали при комнатной температуре 1 ч при непрерывном перемешивании. По окончании реакции продукт осаждали добавлением к реакционной смеси 1/10 объема NaOAc (3 М), 4 объемов этанола (96%) и инкубировали при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение ночи.

Конъюгирование с Alexa Fluor-488 проводили в реакционной смеси объемом 250 мкл. К 45 мкл водного раствора антисмысловой цепи siРНК с амиолинкером С6 на 3'-конец в концентрации 0.5 мМ добавляли 165 мкл тетрабората натрия (рН 8.5) и 40 мкл свежеприготовленного 10 мМ сульфодихлорфенилового эфира Alexa Fluor-488 (Sigma-Aldrich, США) в ДМСО, после чего смесь инкубировали при комнатной температуре 3 ч при непрерывном перемешивании. По окончании реакции продукт осаждали добавлением 1/10 объема 3 М NaOAc, 4 объемов этанола (96%) и инкубировали при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение ночи.

Дуплексы siРНК получали эквимольным добавлением цепей siРНК (200 мкМ) в раствор, содержащий 30 мМ HEPES-KOH (рН 7.4), 100 мМ ацетат натрия и 2 мМ ацетат магния, и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Выделение моноцитарно-лимфоцитарной фракции из периферической крови человека (РВМС).** Периферическую кровь здорового донора с антикоагулянтom разбавляли стерильным PBS (MP Biomedicals, США) в 4 раза. Разведенную кровь (5 мл) наслаивали на 2 мл среды для разделения лейкоцитов LSM (MP Biomedicals, США) с плотностью 1.077–1.080 г/мл и центрифугировали в течение 15 мин при 800 g. Белое кольцо лейкоцитов собирали пипеткой и переносили в чистую пробирку. Лейкоциты промывали 2 раза, для этого добавляли 5 мл среды IMDM (Sigma-Aldrich, США) без сыворотки и антибиотиков, ресуспендировали, центрифугировали 10 мин при 800 g, отбিরали супернатант и повторяли процедуру. Клетки высевали на чашки Петри и культивировали в среде IMDM с 10% FBS (HyClone, США), пенициллином (10 ед./мл), стрептомицином (100 мкг/мкл) и амфотерицином (0.25 мкг/мкл) (5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ).

Образцы периферической крови здоровых доноров ( $n = 3$ ) были предоставлены лабораторией генной диагностики Центра новых медицинских технологий (Новосибирск, Россия).

**Определение эффективности накопления холестеринных производных siРНК в РВМС с помощью проточной цитофлуориметрии.** РВМС высевали на 48-луночные планшеты ( $3 \times 10^5$  клеток/луночку) в ростовой среде IMDM и добавляли к ним холестеринные производные siРНК в Opti-Mem (Invitrogen, США) до конечной концентрации в лунке 0.2–5.0 мкМ, трансфекцию siРНК при помощи Липофектамина (Invitrogen, США) проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Через 4 ч готовили препараты для анализа методом проточной цитофлуориметрии.

Для приготовления препаратов удаляли ростовую среду и дважды промывали клетки раствором PBS, после чего клетки снимали трипсином и переносили в 1.5-мл пробирки. После этого клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, удаляли супернатант и суспендировали осадок в PBS. Суспензию клеток вновь центрифугировали в течение 5 мин при 200 g, супернатант удаляли, суспендировали клетки в 250 мкл PBS и фиксировали клетки добавлением 250 мкл свежеприготовленного 4%-ного раствора формальдегида в PBS. Полученные данные анализировали на проточном цитофлуориметре, используя программное обеспечение Cytomics FC 500 CXP (Beckman Coulter, США). Интенсивность флуоресценции клеток в RFU (относительные единицы флуоресценции) измеряли на длине волны возбуждения лазера 488 нм. Для каждого препарата проводили измерение 8000 клеток, количество Alexa Fluor-488-положительных клеток оценивали с использованием длинноволнового оптического фильтра ( $530 \pm 30$ ) нм. За эффективность трансфекции принимали количество клеток (%), уровень флуоресценции которых превышал максимальный уровень автофлуоресценции клеток в контроле. Кроме того, оценивали средний уровень флуоресценции (в RFU) популяции клеток в образцах, трансфицированных siРНК, в качестве контроля использовали необработанные клетки.

**Определение эффективности накопления холестеринных производных siРНК в клетках крови с помощью проточной цитофлуориметрии *ex vivo*.** К периферической крови человека с антикоагулянтом добавляли флуоресцентно-меченые конъюгаты siРНК до конечной концентрации в лунке 2–5 мкМ. Трансфекцию неконъюгированной siРНК проводили при помощи Липофектамина в концентрации 0.2 мкМ в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Через 3.5 ч после начала трансфекции к клеткам добавляли конъюгаты антител и флуоресцентных красителей для идентификации различных популяций клеток (CD14-Phycoerythrin (Invitrogen, США), CD66-Phycoerythrin/Cy5, CD3-Phycoerythrin и CD19-Phycoerythrin (Abcam, США)). По истечении времени трансфекции (4 ч) эритроциты лизировали добавлением 40 объемов свежеприготовленного раствора

150 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 мМ ЭДТА (pH 7.5) в течение 7 мин, затем клетки центрифугировали (5 мин, 200 g), отмывали PBS и фиксировали 2%-ным раствором формальдегида в PBS. Далее проводили анализ флуоресценции на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 CXP с использованием каналов флуоресценции ( $530 \pm 30$ ), ( $572 \pm 30$ ) или ( $675 \pm 30$ ) нм.

**Определение динамики изменения концентрации siРНК и ее холестерин-содержащих аналогов в плазме мышей после внутривенного введения.** В работе использовали 10–14-недельных самок мышей линии C57BL/6 ( $n = 9$ , по 3 мыши в каждой экспериментальной группе) разведения вивария Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Животных содержали по 8–10 особей в клетке, мыши имели свободный доступ к еде и воде. После введения 0.5 мкг/г siРНК или ее холестеринного производного в объеме 100 мкл в хвостовую вену мышей проводили забор крови из ретроорбитального синуса через 5 мин, 2, 3 и 24 ч. Кровь центрифугировали (5 мин при 500 g), образцы плазмы разбавляли в 10 раз раствором для лизиса клеток (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, 0.25% Triton X-100). Далее проводили выделение siРНК, для этого раствор нагревали до  $95^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Затем образцы охлаждали на льду (10 мин) и центрифугировали (10 мин,  $4^\circ\text{C}$ , 12000 g). Отобранный супернатант нагревали до  $95^\circ\text{C}$  (10 мин) и сразу добавляли в готовую смесь БиоМастер для ОТ-ПЦР (Биолабмикс, Россия) из расчета 2 мкл супернатанта на 38 мкл смеси Биомастер с использованием праймера 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACCAGAGCCAACCTTGGCT-3'. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре  $42^\circ\text{C}$ . Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени при помощи амплификатора iCycler iQ5 (BioRad, США), используя готовую смесь HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс, Россия) и праймеры 5'-GTTGGGGATATACAACCTTGTCA-3' (прямой) и 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (обратный). Нормирование проводили путем построения калибровочных кривых с использованием известного количества siРНК (10, 1 и 0.1 пмоль), добавляемых к такому же количеству плазмы, как в пробах. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ5 v.2.0 (Bio-Rad, США).

**Исследование накопления siРНК и ее холестерин-содержащих аналогов в клетках крови мышей.** Мышам линии C57BL/6 внутривенно вводили 1.7 и 9 мкг/г флуоресцентно-меченой siРНК; через 0.5, 1 и 4 ч после инъекции у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса. Популяции клеток окрашивали соответствующими антителами с флуоресцентными метками (CD11b-Phycoeryth-

rin/Cy5 (Invitrogen, США), CD20-Phycoerythrin/Cy5 и CD3-Phycoerythrin (Abcam, США) в течение 20 мин. Затем проводили лизирование эритроцитов, как описано выше, и анализ флуоресценции клеток на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 СХР.

**Накопление siРНК и ее холестерин-содержащих аналогов в костном мозге и спленоцитах мышей.** Мышам линии С57BL/6 проводили внутривенные инъекции 9 мкг/г siРНК или ее конъюгата с холестерином. Через 6 ч после этого животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков и проводили выделение костного мозга и спленоцитов. Для этого извлекали бедренные и большие берцовые кости. Концы костей удаляли, диафизы дважды промывали 3 мл буфера PBS. Клетки суспендировали, лизирование эритроцитов осуществляли, как описано выше, после этого готовили препараты и анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 СХР. Для получения спленоцитов извлекали селезенку и гомогенизировали ее раздавливанием между стеклами. Гомогенат смывали со стекла 3–4 мл буфера PBS. Лизирование эритроцитов в клеточной суспензии осуществляли, как описано выше, после этого готовили препараты и анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 СХР.

**Статистический анализ данных.** Для получения статистически достоверных результатов экспериментальные точки повторяли минимум трехкратно, результаты измерений представляли в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD), для оценки достоверности результатов использовали критерий Стьюдента.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-04-00251) и проекта базового бюджетного финансирования Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210024-8.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных выполнены в соответствии с протоколом, утвержденным Межинститутской комиссией по биоэтике СО РАН (протокол № 22.11 от 30.05.2014), и рекомендациями по правильному использованию и уходу за лабораторными животными (European Communities Council Directive 86/609/CEE).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Setten R.L., Rossi J.J., Han S.-P.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. P. 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
2. *Chernikov I.V., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444>
3. *Kolosenko I., Edsbäcker E., Björklund A.-C., Hamil A.S., Goroshchuk O., Grandér D., Dowdy S.F., Palm-Apergi C.* // J. Control. Release. 2017. V. 261. P. 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.002>
4. *Benizri S., Gissot A., Martin A., Valet B., Grinstaff M.W., Barthélémy P.* // Bioconj. Chem. 2019. V. 30. P. 366–383. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00761>
5. *Shinkai Y., Kashihara S., Minematsu G., Fujii H., Nae-mura M., Kotake Y., Morita Y., Ohnuki K., Fokina A.A., Stetsenko D.A., Filichev V.V., Fujii M.* // Nucleic Acid Ther. 2017. V. 27. P. 168–175. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0647>
6. *Landry B., Valencia-Serna J., Gul-Uludag H., Jiang X., Janowska-Wieczorek A., Brandwein J., Uludag H.* // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2015. V. 4. P. e240. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.13>
7. *Wang Y.H., Motoji T., Motomura S., Shiozaki H., Tsuruo T., Mizoguchi H.* // Eur. J. Haematol. 1997. V. 58. P. 186–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1997.tb00946.x>
8. *Petrova N.S., Chernikov I.V., Meschaninova M.I., Dovydenko I.S., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. 2330–2344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1002>
9. *Chernikov I.V., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // J. Hematol. Oncol. Res. 2016. V. 2. P. 13. <https://doi.org/10.14302/issn.2372-6601.jhor-15-822>
10. *Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Meschaninova M.I., Karelina U.A., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Nucleic Acid Ther. 2019. V. 29. P. 33–43. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0745>
11. *Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L.* // Oligonucleotides. 2009. V. 19. P. 191–202. <https://doi.org/10.1089/oli.2008.0162>
12. *Logashenko E.B., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Repkova M.N., Ven'yaminova A.G., Vlasov V.V.* // Dokl. Biochem. Biophys. 2002. V. 386. P. 296–297. <https://doi.org/10.1023/a:1020732216541>
13. *Logashenko E.B., Vladimirova A.V., Repkova M.N., Venyaminova A.G., Chernolovskaya E.L., Vlassov V.V.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2004. V. 23. P. 861–866. <https://doi.org/10.1081/NCN-200026032>
14. *Logashenko E.B., Vladimirova A.V., Volkov A.A., Repkova M.N., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L., Vlassov V.V.* // Russ. Chem. Bull. 2006. V. 55. P. 1275–1283. <https://doi.org/10.1007/s11172-006-0411-z>

15. Chernikov I.V., Karelina U.A., Meschaninova M.I., Ven'yaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 766–773.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060128>
16. Ly S., Navaroli D.M., Didiot M.-C., Cardia J., Pandarinnathan L., Alterman J.F., Fogarty K., Standley C., Lifshitz L.M., Bellve K.D., Prot M., Echeverria D., Corvera S., Khvorova A. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 15–25.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1005>
17. Osborn M.F., Coles A.H., Biscans A., Haraszti R.A., Roux L., Davis S., Ly S., Echeverria D., Hassler M.R., Godinho B.M.D., Nikan M., Khvorova A. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 1070–1081.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1232>
18. Agrawal N., Toner M., Irimia D. // *Lab. Chip.* 2008. V. 8. P. 2054–2061.  
<https://doi.org/10.1039/B813588F>
19. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Costien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska L., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliansky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.-P. // *Nature.* 2004. V. 432. P. 173–178.  
<https://doi.org/10.1038/nature03121>
20. Nishina K., Unno T., Uno Y., Kubodera T., Kanouchi T., Mizusawa H., Yokota T. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. P. 734–740.  
<https://doi.org/10.1038/mt.2008.14>
21. McNamara J.O., Andrechek E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1005–1015.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1223>
22. Xia C.-F., Boado R.J., Pardridge W.M. // *Mol. Pharm.* 2009. V. 6. P. 747–751.  
<https://doi.org/10.1021/mp800194y>
23. Moschos S.A., Jones S.W., Perry M.M., Williams A.E., Erjefalt J.S., Turner J.J., Barnes P.J., Sproat B.S., Gait M.J., Lindsay M.A. // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. P. 1450–1459.  
<https://doi.org/10.1021/bc070077d>
24. Nakase I., Tanaka G., Futaki S. // *Mol. Biosyst.* 2013. V. 9. P. 855–861.  
<https://doi.org/10.1039/c2mb25467k>
25. Khatri N., Rathi M., Baradia D., Trehan S., Misra A. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2012. V. 29. P. 487–527.  
<https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v29.i6.20>
26. Nechaev S., Gao C., Moreira D., Swiderski P., Jozwiak A., Kowolik C.M., Zhou J., Armstrong B., Raubitschek A., Rossi J.J., Kortylewski M. // *J. Control. Release.* 2013. V. 170. P. 307–315.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.007>
27. Zhang Q., Hossain D.M.S., Nechaev S., Kozłowska A., Zhang W., Liu Y., Kowolik C.M., Swiderski P., Rossi J.J., Forman S., Pal S., Bhatia R., Raubitschek A., Yu H., Kortylewski M. // *Blood.* 2013. V. 121. P. 1304–1315.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442590>
28. Proudnikov D., Mirzabekov A. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4535–4542.  
<https://doi.org/10.1093/nar/24.22.4535>

## Interaction of Lipophilic Conjugates of Modified siRNAs with Hematopoietic Cells *in vitro* and *in vivo*

I. V. Chernikov\*, M. I. Meshchaninova\*, D. V. Gladkikh\*,  
A. G. Ven'yaminova\*, M. A. Zenkova\*, V. V. Vlassov\*, and E. L. Chernolovskaya\*, #

#E-mail: elena\_ch@niboch.nsc.ru

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

Delivery of siRNAs to blood cells is one of the most difficult tasks, since there are no efficient and non-toxic methods of delivering nucleic acids to these cells *in vivo*. Conjugation of siRNAs with targeted or lipophilic transport molecules is one of the most promising approaches to solving this problem, since it can provide efficient accumulation without toxic side effects. Therefore, in this work, we conjugated siRNA with lipophilic molecules for its delivery to PBMC (primary blood mononuclear cells) and whole blood cells. We have shown that among the studied molecules, cholesterol is the most promising agent for this purpose. Further screening of conjugates along the length of the linker connecting siRNA and cholesterol showed that a linker containing 6 carbon atoms is optimal for the most efficient delivery of siRNA into human cells as part of whole blood. The selected cholesterol conjugate siRNA was also efficiently accumulated in mouse blood cells and splenocytes after intravenous injection.

*Keywords:* siRNA, chemical modifications, cholesterol, lipophilic conjugates, hematopoietic cells, delivery to cells



## ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОКОМПЛЕКСОВ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА БЕЛОК VP72, В КЛЕТКАХ VERO, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

© 2021 г. А. В. Акобян\*, Е. А. Буракова\*\*, \*\*\*, Э. А. Арабян\*, А. А. Фокина\*\*, \*\*\*,  
А. Р. Коцинян\*, С. В. Васильева\*\*\*\*, О. С. Закарян\*, Д. А. Степенко\*\*, \*\*\*, #

\*Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения,  
Армения, 0014 Ереван, ул. Асратяна, 7

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

\*\*\*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10

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

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 11.10.2020 г.

Принята к публикации 14.10.2020 г.

Антисмысловые олигодезоксирибонуклеотиды с тиофосфатными или мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами, нацеленные на мРНК основного капсидного белка VP72 вируса африканской чумы свиней (АЧС), в свободном виде с трансфекцией Липофектаминоном 3000 или в виде ионных комплексов с аминомодифицированными мезопористыми наночастицами диоксида кремния были исследованы на противовирусную активность в клетках Vero, инфицированных вирусом АЧС. Была отмечена относительно высокая цитотоксичность наноконструкций олигонуклеотидов для клеток Vero в концентрациях выше 500 нМ. В ходе экспериментов по определению противовирусной активности были идентифицированы две последовательности антисмысловых олигонуклеотидов, на порядок снижавшие титр вируса в концентрации 500 нМ. При этом противовирусный эффект наноконструкций превосходил активность свободных олигонуклеотидов в присутствии Липофектамина 3000, что свидетельствует о более эффективной доставке наноконструкций в клетки. Антисмысловые олигонуклеотиды, способные снижать репликацию вируса АЧС, до сих пор не были известны из литературы. Полученные данные могут служить отправной точкой для дальнейших исследований по созданию противовирусных препаратов на основе олигонуклеотидов против вируса африканской чумы свиней.

*Ключевые слова:* олигодезоксирибонуклеотиды, тиофосфаты, мезилфосфорамиды, мезопористые наночастицы диоксида кремния, ингибирование трансляции

DOI: 10.31857/S0132342321020032

### ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС, англ. African swine fever, ASF) относится к наиболее опасным вирусным болезням домашних и диких свиней [1].

Сокращения: APTEs – 3-аминопропилтриэтоксисилан; СТАВ – бромид цетилтриметиламмония; DMTr – 4,4'-диметокситригил; MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (лазерная десорбционная ионизация в присутствии матрицы) Time Of Flight (времяпролетная) масс-спектрометрия; TCID<sub>50</sub> – цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток; TEAA – ацетат триэтиламмония; АЧС – африканская чума свиней. Все приведенные последовательности нуклеотидов 5'–3'; префикс d в обозначениях олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-49-63; эл. почта: d.stetsenko@nsu.ru).

Возбудитель болезни – вирус африканской чумы свиней (African swine fever virus, ASFV) – представляет собой ДНК-содержащий вирус из рода *Asfivirus*, принадлежащего к семейству *Asfarviridae*. Высоковирулентные штаммы вируса АЧС могут приводить к 100%-ной смертности среди инфицированных животных.

АЧС эндемична в большинстве стран Африки, расположенных к югу от Сахары, где распространено свиноводство [2]. Первая вспышка АЧС в Европе была отмечена на Пиренейском полуострове в 1950-е гг., что вызвало дальнейшие спорадические вспышки в других европейских странах, таких как Франция, Италия, Бельгия, Нидерланды и Мальта [3]. В этих странах инфекция была к

началу XXI века уничтожена посредством строгого контроля и программ искоренения, за исключением Сардинии, где она по-прежнему распространена среди домашних свиней. Однако АЧС вновь была занесена на европейский континент в 2007 г. через Грузию, из которой она распространилась в Армении, России, Белоруссии, Украине, Латвии, Литве и Эстонии [4].

АЧС имеет серьезные социально-экономические последствия как в случае стран с вновь обнаруженными очагами, так и в странах, где она является эндемичной в течение длительного времени. Особенно высоко ее влияние в тех странах, где значительную роль играет коммерческое свиноводство. Например, вспышки АЧС в Армении привели к огромным экономическим потерям. По данным Национальной статистической службы Республики Армения за 2014 г., в течение первого года вспышек АЧС (2007–2008 гг.) общее поголовье свиней в Армении сократилось на 56%, а объемы производства свинины снизились с 13 300 до 7500 т. Это имело серьезные последствия для продовольственной безопасности, т.к. продукция свиноводства является важным источником пищевого белка в Армении.

С 2007 г. продолжается распространение АЧС среди диких и домашних свиней на территории как европейской, так и азиатской части России. Суммарно в России было зафиксировано более 500 вспышек этого заболевания, было уничтожено более миллиона животных, а экономические потери превысили 30 млрд рублей [5, 6].

Борьба с АЧС опирается на раннее выявление очага инфекции и осуществление карантинных мероприятий, в том числе убоя зараженных свиней [7]. Однако в силу ряда социокультурных факторов, таких как традиция свободного выгула свиней, незаконное перемещение животных и зараженного мяса, а также существование цикла с лесным природным носителем (дикий кабан), риск возникновения вспышек АЧС как в России, так и в Армении остается значительным. По данным Европейского управления по безопасности пищевых продуктов (EFSA) и Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO), существует высокий риск сохранения АЧС в странах при недостаточных мерах санитарии и плохой организации борьбы с заболеванием. Таким образом, вспышки АЧС представляют собой значительную экономическую проблему как для Армении, так и для России.

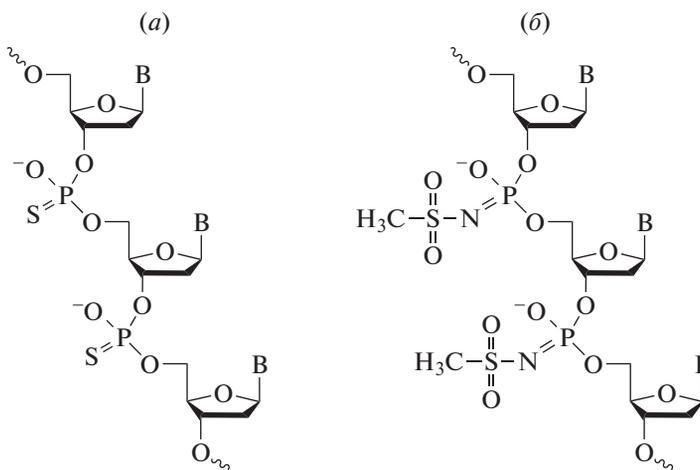
Ситуация осложняется тем, что на сегодняшний день еще не создано вакцины против АЧС [8]. Из-за отсутствия эффективных вакцин применение противовирусных средств представляет собой альтернативный подход к борьбе с АЧС и снижению экономического ущерба от этого заболевания. Таким образом, поиск и разработка про-

тивовирусных препаратов, которые могут оказаться перспективным инструментом контроля за распространением АЧС, имеют особую актуальность.

Способность антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) избирательно ингибировать экспрессию вирусных генов за счет комплементарного связывания с определенными последовательностями мРНК была впервые экспериментально продемонстрирована более 40 лет назад на примере вируса саркомы Рауса [9]. Бурное развитие химии и биологии нуклеиновых кислот в 1980–1990-е гг. предопределило возросший интерес к АСО в качестве инструментов нового терапевтического подхода к лечению не только вирусных инфекций человека, но и генетических и онкологических заболеваний, а также инфекционных болезней, вызываемых патогенными микроорганизмами [10–12]. В частности, противовирусный препарат фомивирсен (Витравен) стал первым официально одобренным лекарством на основе олигонуклеотида (1998 г.) [13].

Однако, несмотря на значительные успехи клинического использования АСО за прошедшие два десятилетия, их широкое внедрение в медицинскую практику до сих пор во многом замедляется недостаточно эффективным проникновением АСО в клетки и, как следствие, неблагоприятной фармакокинетикой [14]. Поэтому остается актуальной разработка систем доставки АСО в клетки, в том числе с использованием современных достижений в области нанотехнологии [15]. В частности, мезопористые наночастицы диоксида кремния  $mSiO_2$  рассматриваются как одна из наиболее перспективных наноразмерных платформ для доставки лекарственных препаратов, в том числе противовирусных [16]. К преимуществам наночастиц  $mSiO_2$  относятся высокая емкость, биоразлагаемость и низкая токсичность [17].

Целью данной работы являлось исследование противовирусной активности наноконструкций, состоящих из аминомодифицированных наночастиц  $mSiO_2$  и антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на ингибирование трансляции основного капсидного белка VP72 в культуре клеток Vero, инфицированных вирусом АЧС. Работа включала в себя получение новых наночастиц  $mSiO_2$  с повышенной плотностью положительного заряда, которые обладали бы пониженной цитотоксичностью, и их электростатически связанных наноконструкций с АСО на основе как традиционных тиофосфатных (рис. 1а), так и новых мезилфосфорамидных олигодезоксирибонуклеотидов (рис. 1б), нацеленных на мРНК VP72. Ранее было показано, что мезилфосфорамидные аналоги ДНК в культуре клеток проявляют высокую антисмысловую активность, превосходящую активность тиофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов [18].



**Рис. 1.** Структуры антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов с модифицированными фосфатными группами: (а) – тиофосфатными (PS); (б) – мезилфосфорамидными ( $\mu$ ). В – азотистое основание: аденин, гуанин, тимин или цитозин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антисмысловые олигонуклеотиды способны блокировать биосинтез вирусных белков путем комплементарного связывания с вирусной РНК и активации ее расщепления клеточными нуклеазами, например, РНКазой Н [19]. Была продемонстрирована противовирусная активность АСО и малых интерферирующих РНК (small interfering RNA, siРНК) в отношении ряда опасных вирусных инфекций [20, 21]. Однако до настоящего времени не было известно ни одного примера АСО, эффективных против вируса АЧС. Нам удалось найти лишь единственное сообщение об ингибировании биосинтеза вирусных белков А151R и VP72 с помощью siРНК [22]. Таким образом, выбор белка VP72 в качестве мишени для антисмыслового ингибирования был обоснован литературными данными. В настоящей работе нам удалось впервые подобрать последовательности АСО, нацеленных на мРНК VP72, которые на порядок снижали титр вируса АЧС в инфицированных клетках Vero при доставке в виде наноконплексов с наночастицами mSiO<sub>2</sub>.

Последовательность гена основного капсидного белка VP72 вируса АЧС (штамм ВА71V) была получена с использованием базы данных PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/M34142.1>). При выборе длины АСО мы руководствовались оптимальной стабильностью каждого из гибридных дуплексов (значение свободной энергии Гиббса от  $-8$  до  $-10$  ккал/моль), образованных АСО с РНК-мишенью, которая способствует максимальной прочности связывания. Способность молекулы мРНК вируса АЧС в области, соответствующей белку VP72, формировать пространственную структуру за счет внутримолекулярных взаимодействий была смоделирована с помощью ком-

пьютерной программы, предсказывающей возможные вторичные структуры молекул ДНК и РНК (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>). Последовательности АСО были нацелены на участки мРНК VP72, не образующие выраженной вторичной структуры. Были подобраны олигонуклеотиды длиной 22–23 нт к трем участкам вирусной мРНК, которые затем были синтезированы в двух вариантах: серия S с тиофосфатными (PS) межнуклеотидными группами и серия D с мезилфосфорамидными ( $\mu$ ) межнуклеотидными группами (см. “Эксперим. часть”). Последовательности и обозначения АСО приведены в табл. 1.

Для улучшения доставки олигонуклеотидов в клетки были использованы аминокфункционализованные мезопористые наночастицы диоксида кремния (mSiO<sub>2</sub>) размером 60–80 нм [17], которые, как мы обнаружили, отличаются относительной устойчивостью к агрегации и меньшей цитотоксичностью для клеток Vero по сравнению с использованными ранее коммерческими аминокфункционализованными наночастицами SiO<sub>2</sub> размером 20–30 нм (SkySpring Nanomaterials Inc., США) [23, 24]. Мезопористые наночастицы mSiO<sub>2</sub>, впервые рассмотренные в работе Vallet-Regi et al. [25], привлекли внимание как средства доставки лекарств из-за высокой химической и термической стабильности, большой площади поверхности, равномерного и настраиваемого размера пор, облегченной функционализации поверхности, низкой токсичности и хорошей биосовместимости [26–30]. Аминокфункционализованные наночастицы mSiO<sub>2</sub> (mSiO<sub>2</sub>–NH<sub>2</sub>) часто применялись для контролируемого высвобождения различных лекарственных препаратов: анальгетиков, антибиотиков, противоопухолевых препаратов и др. [31–39]. Функционализация по-

**Таблица 1.** Последовательности и молекулярные массы антисмысловых олигонуклеотидов

| Код         | Последовательность, 5'–3'   | Молекулярная масса, Да     |                             |
|-------------|---|----------------------------|-----------------------------|
|             |   | расч. [M – H] <sup>–</sup> | эксп.* [M – H] <sup>–</sup> |
| <b>S054</b> | T <sub>5</sub> G <sub>5</sub> C <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A <sub>5</sub> G <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> C <sub>5</sub> G <sub>5</sub> T <sub>5</sub> T <sub>5</sub> T <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> G <sub>5</sub> C <sub>5</sub> T <sub>5</sub> G                | 7176.57                    | 7168.80                     |
| <b>S055</b> | A <sub>5</sub> T <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A <sub>5</sub> C <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> G <sub>5</sub> C <sub>5</sub> T <sub>5</sub> C <sub>5</sub> C <sub>5</sub> T <sub>5</sub> C <sub>5</sub> C <sub>5</sub> T <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A | 7362.78                    | 7371.10                     |
| <b>S056</b> | T <sub>5</sub> T <sub>5</sub> A <sub>5</sub> T <sub>5</sub> C <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A <sub>5</sub> T <sub>5</sub> A <sub>5</sub> A <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A <sub>5</sub> T <sub>5</sub> T <sub>5</sub> G <sub>5</sub> A <sub>5</sub> T <sub>5</sub> A <sub>5</sub> C <sub>5</sub> C  | 6420.03                    | 6429.40                     |
| <b>D605</b> | T <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> G                | 8458.62                    | 8466.20                     |
| <b>D607</b> | T <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> C  | 7579.98                    | 7588.70                     |
| <b>D608</b> | A <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> A <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> C <sup>μ</sup> T <sup>μ</sup> G <sup>μ</sup> A | 8705.88                    | 8711.50                     |

\* По данным масс-спектрометрии MALDI-TOF. Обозначения: S – тиофосфатная группа, μ – мезилфосфорамидная группа.

**Таблица 2.** Изучение способности аминоксидированных мезопористых наночастиц SiO<sub>2</sub> к комплексообразованию с модельным олигонуклеотидом **T403**\*

| Наноконплекс                                | mSiO <sub>2</sub> –NH <sub>2</sub> | mSiO <sub>2</sub> –R2                          | mSiO <sub>2</sub> –R3                                   | Au@SiO <sub>2</sub> –NH <sub>2</sub> [17] |
|---|------------------------------------|--|---|---|
| Силан                                       | APTES                              | 3-(2-Аминоэтиламино)-пропилдиметоксиметилсилан | 3-[2-(2-Аминоэтиламино)-этиламино]пропилтриметоксисилан | APTES                                     |
| Емкость, нмоль                              | 8.65<br>(52 мкг/мг)                | 13.10<br>(79 мкг/мг)                           | 8.42<br>(51 мкг/мг)                                     | 0.90<br>(5.4 мкг/мг)                      |
| Массовое отношение mSiO <sub>2</sub> /T403* | 19.2                               | 12.7   | 19.7  | 184                                       |
| ξ-Потенциал, мВ                             | –                                  | +23.7<br>(до комплексообразования +32.3)       | –   | –   |

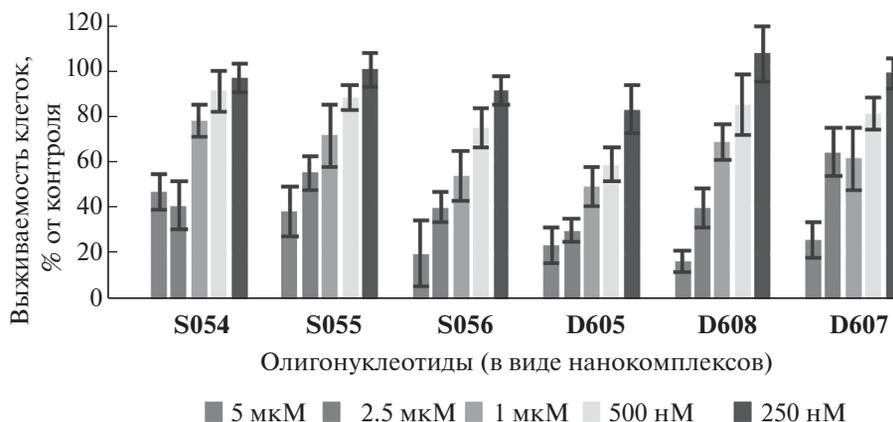
\* 17-звенный олиго-2'-O-метилрибонуклеотид: 5'-A<sup>τ</sup>GUCUCGACUUGCUACC-3'; τ – тозилфосфорамидная группа; M<sub>r</sub> 6031.11 [47]. Прочерк – значение не определяли.

верхности аминогруппами в указанных статьях проводилась, как правило, с помощью 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES). В данной работе проводили функционализацию поверхности наночастиц mSiO<sub>2</sub> остатками 1,2-этилендиамина с целью увеличения плотности катионных групп для улучшения электростатического комплексообразования с анионными олигонуклеотидами, несущими модифицированные фосфатные группы: тиофосфатные или мезилфосфорамидные (рис. 1а и 1б соответственно). Для этого наночастицы обрабатывали 3-(2-аминоэтиламино)-пропилдиметоксиметилсиланом в условиях, аналогичных функционализации APTES. Данные наночастицы (mSiO<sub>2</sub>–R2) оказались самыми эффективными по связыванию олигонуклеотида в электростатический комплекс. Наночастицы, модифицированные APTES или 3-[2-(2-аминоэтиламино)-этиламино]пропилтриметоксисиланом или содержащие золотое ядро (Au@SiO<sub>2</sub>–NH<sub>2</sub>) [17], показали меньшую загрузку по олигонуклеотиду в тех же условиях (табл. 2). ξ-Потенциал наноконплекса mSiO<sub>2</sub>–R2 с модельным 17-звенным олиго-

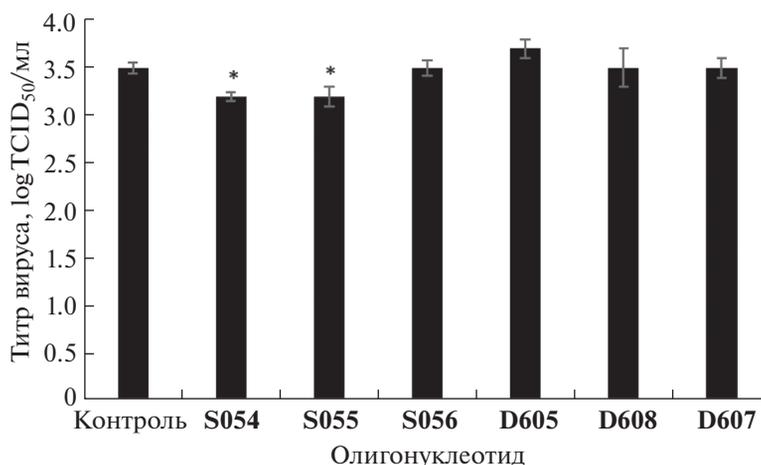
нуклеотидом **T403** оставался положительным, однако его величина уменьшалась с +32.3 до +23.7, что согласуется с образованием ионного комплекса (табл. 2). Массовое отношение (mSiO<sub>2</sub>–R2/T403) составило 12.7, что почти вдвое выше отношения, полученного в работе Xu et al. [40]. В работе Xu et al. использовали такой же аминоксилан и 18-звенный олигонуклеотид, однако наночастицы SiO<sub>2</sub> не были мезопористыми.

Таким образом, в качестве эффективного носителя для доставки олигонуклеотидов для дальнейших экспериментов были выбраны модифицированные этилендиаминовыми группами наночастицы мезопористого диоксида кремния mSiO<sub>2</sub>–R2. Полученные наночастицы, имеющие положительный ξ-потенциал при pH 7.0, были использованы для формирования ионных наноконплексов с АСО (табл. 1), биологическая активность которых была исследована далее.

Определение цитотоксичности наноконплексов АСО для клеток Vero с помощью МТТ-теста выявило выраженную цитотоксичность при концентрациях >500 нМ (рис. 2), в то время как сво-



**Рис. 2.** Цитотоксичность наноконструкций антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) для клеток Vero по результатам тестов МТТ. Последовательности АСО представлены в табл. 1.



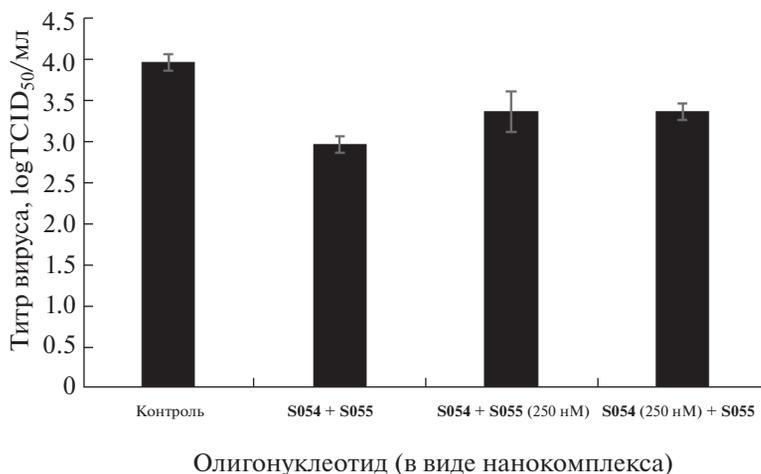
**Рис. 3.** Титр вируса АЧС (log TCID<sub>50</sub>/мл) после воздействия наноконструкций АСО через 24 ч после инфицирования клеток Vero вирусом АЧС. Достоверность результатов оценивали с помощью двустороннего *t*-критерия Стьюдента. \*  $p < 0.05$ .

бодные олигонуклеотиды без наночастиц показали меньшую цитотоксичность, что могло быть вызвано тем, что олигонуклеотиды слабее проникали в клетки вне наноконструкций. В последующих экспериментах наноконструкции олигонуклеотидов **S054** и **S055** были использованы в концентрации 500 нМ, а наноконструкции олигонуклеотидов **S056**, **D605**, **D607**, **D608** – в концентрации 250 нМ.

Для изучения противовирусного эффекта клетки Vero инфицировали вирусом АЧС ВА71V, после чего сразу же обрабатывали наноконструкциями указанных олигонуклеотидов. Контрольная группа клеток Vero была обработана АСО в присутствии трансфекционного реагента Липофектамин 3000 (Invitrogen, США), после чего клетки инфицировали вирусом АЧС и определяли противовирусную активность вышеупомянутых олигонуклеотидов вне наноконструкций.

Наноконструкции **S054** и **S055** уменьшали титр вируса на  $\sim 0.3 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ , что эквивалентно  $\sim 60\%$  подавления (рис. 3). При применении свободных АСО противовирусная активность была выражена слабее ( $< 0.3 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ ), что свидетельствует о том, что олигонуклеотиды в составе наноконструкций лучше проникают в клетку и, как следствие, проявляют более выраженную противовирусную активность.

На следующем этапе исследований было изучено комбинированное влияние наноконструкций олигонуклеотидов на репродукцию вируса АЧС. Для этого инфицированные клетки обрабатывали тремя группами наноконструкций АСО: 1) по 500 нМ **S054** и **S055**; 2) 250 нМ **S054** и 500 нМ **S055**; и 3) 500 нМ **S054** и 250 нМ **S055**. Максимальное падение титра вируса ( $\sim 1.0 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ ) было за-



**Рис. 4.** Изменение титра вируса АЧС (logTCID<sub>50</sub>/мл) при комбинированном воздействии двух наиболее активных наноконцентраций АСО в различных концентрациях. Достоверность результатов оценивали с помощью двустороннего *t*-критерия Стьюдента. \*  $p < 0.05$ .

фиксируется в случае, когда концентрация обоих наноконцентраций составляла 500 нМ (рис. 4).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и оборудование.** Для офВЭЖХ использовали ацетонитрил UHPLC grade Supergradient (Panreac, Испания). Раствор (2 М) ацетата триэтиламмония (ТЕАА), рН 7.0, был приготовлен из триэтиламина ACS grade (Panreac, Испания) и ледяной уксусной кислоты (осч, Россия). Дихлоруксусная кислота, иод, 0.25 М раствор 4,5-дицианимидазола (DCI) в безводном ацетонитриле, тетраэтилортосиликат, 3-(2-аминоэтиламино)пропилдиметоксиметилсилан, красители Stains-All, ксиленцианол FF и бромфеноловый синий (BP) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (США); метансульфохлорид, азид натрия и перхлорат натрия – у Acros Organics (США), дихлорметан, тетрагидрофуран, пиридин и триэтиламин – у Panreac (Испания). Формамид, акриламид, *N,N'*-метилен-*bis*-акриламид, мочевины, *трис*(гидроксиметил)-аминометан (Трис), борная кислота, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na<sub>2</sub>ЭДТА) были приобретены у компании Диаэм (Россия). Концентрированный водный раствор аммиака (осч), концентрированная HCl (осч), уксусная кислота (осч), ацетон (осч), *n*-гексан и этанол были отечественного производства. Все реактивы были наивысшей степени чистоты, доступной у соответствующих коммерческих поставщиков. Ацетонитрил (UHPLC grade Supergradient, Panreac, Испания) для синтеза олигонуклеотидов кипятили 6 ч над CaH<sub>2</sub> в атмосфере аргона, затем перегоняли в атмосфере аргона и хранили под аргоном над молекулярными ситами 3 Å. Бидистил-

лированную воду подготавливали непосредственно в лаборатории.

Для центрифугирования небольших объемов растворов использовали микроцентрифугу Mini-Spin Plus (Eppendorf, ФРГ). Химические реакции проводили с использованием термешейкера Thermomixer Compact (Eppendorf, ФРГ). Растворы встряхивали с помощью вортекса BioVortex V1 (Biosan, Эстония). Гель-электрофорез проводили с использованием установки для электрофореза (Bio-Rad, США). Небольшие объемы растворов олигонуклеотидов (до 1.5 мл) концентрировали с помощью вакуумного концентратора Savant SpeedVac DNA1200P (Thermo Fisher Scientific, США).

Олигонуклеотиды были получены с помощью автоматического синтезатора ДНК/РНК ASM-800 (ООО “Биосет”, Новосибирск, Россия) согласно протоколу фосфитамидного синтеза в стандартных реакторах объемом 25–50 мкл в масштабе 0.2–0.4 мкмоль из соответствующих β-цианэтил-*N,N*-диизопропилфосфитаминов дезоксирибонуклеозидов и полимерных носителей на основе пористого стекла с размером пор 1000 Å с привитыми дезоксирибонуклеозидами (Sigma-Aldrich, США). Тиофосфатные (PS) олигонуклеотиды [41] синтезировали с использованием 0.05 М раствора 3-((диметиламиноэтилиден)амино)-3*H*-1,2,4-дитиазол-3-тиона (Sulfurizing Reagent II; Glen Research, США) в смеси пиридин–ацетонитрил (1 : 1, v/v). Мезилфосфорамидные (μ) олигонуклеотиды синтезировали по оригинальной методике при помощи реакции Штаудингера на твердой фазе с использованием мезилазида (метансульфонилиазида) [42]. Мезилазид получали *in situ* из метансульфохлорида и азида натрия в ацетонитриле согласно работе Matano et al. [43] и использовали в виде 0.5 М раствора в ацетонитриле (**ОСТОРОЖНО! Мезилазид в**

**чистом виде может быть взрывоопасен!** [44]). ИК-,  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры полученного мезилазида были идентичны приведенным в литературе [43].

Для аналитической ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1220 (Agilent Technologies, США) с УФ-детекцией при длине волны 260 нм, колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 мкм,  $4,6 \times 150$  мм; Agilent Technologies, США). Элюцию осуществляли в градиенте ацетонитрила в 20 мМ ТЕАА, pH 7.0, от 0 до 60% за 30 мин и скорости потока 1 мл/мин. Выделение олигонуклеотидов проводили с помощью хроматографа Waters 600E (Waters Corp., США) с УФ-детекцией при длинах волн 190, 260, 280 нм и колонкой ZORBAX Eclipse PrepHT XDB-C18 (7 мкм,  $21,2 \times 150$  мм; Agilent Technologies, США) в градиенте ацетонитрила в 20 мМ ТЕАА, pH 7.0, от 0 до 60% за 30 мин при скорости потока 21 мл/мин.

PS-олигодезоксирибонуклеотиды получали с 4,4'-диметокситритильной группой (DMTr) на 5'-конце, собирали DMTr-содержащую фракцию, DMTr-группу отщепляли обработкой 80%-ной уксусной кислотой при комнатной температуре в течение 15 мин, осаждали олигонуклеотид 3%-ным  $\text{NaClO}_4$  в ацетоне, отделяли осадок центрифугированием, промывали ацетоном, высушивали на воздухе, растворяли в бидистиллированной воде и определяли концентрацию по оптической плотности раствора с помощью УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific, США).

$\mu$ -Олигонуклеотиды были синтезированы в режиме без сохранения 5'-DMTr-группы ("DMTr OFF") с выделением с помощью препаративного гель-электрофореза в 20%-ном ПААГ толщиной 2–3 мм в денатурирующих условиях и обессоливанием на колонке NAP-25 с сорбентом Sephadex G-25 (GE Healthcare, Великобритания) в виде натриевой соли. Для контроля качества олигонуклеотидов проводили аналитический электрофорез в 20%-ном ПААГ толщиной 0.4 мм в аналогичных условиях: акриламид –  $N,N'$ -метилден-бис-акриламид (30 : 1), 8 М мочевины, 90 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  при напряжении 50 В/см. Олигонуклеотиды наносили в растворе, содержащем 8 М мочевины, 0.05% ксиленицианола FF и 0.05% бромфенолового синего. Визуализацию полос проводили окрашиванием геля раствором красителя Stains-All (500 мг/л) в формамиде с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF на приборе Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия). Масс-спектры олигонуклеотидов получали в линейном режиме отрицательных ионов прибора и в диапазоне  $m/z$  от 500 до 16000 Да. Параметры измерения включали также частоту импульсов 25 Гц, ускоряющее напряжение 25.0 кВ и время задержки экстракции ионов

120 нс. Образцы олигонуклеотидов растворяли до концентрации 0.1 мМ в водном буфере, содержащем 20 мМ ТЕАА и 60% ацетонитрила. Объем анализируемого образца составлял 10 мкл. Аликвоту раствора образца объемом 0.7 мкл смешивали на подложке (Ground Steel или AnchorChip) с 0.7 мкл раствора матрицы, приготовленного согласно базовому протоколу производителя (Bruker Daltonics, Германия). Матрицей для ионизации олигонуклеотидов в отрицательном режиме служил 2,6-дигидроксиацетофенон (2,6-DHAP) с добавлением дигидроцитрата аммония. Итоговый масс-спектр получали суммированием 8–20 одиночных спектров по 100 импульсов лазера на точку. Калибровку прибора проводили с использованием калибровочных стандартов (Bruker Daltonics, Германия), а также набора олигодезоксирибонуклеотидов с известными массами. Молекулярные массы олигонуклеотидов рассчитывали, используя наборы экспериментальных значений  $m/z$ , определенных для каждого анализируемого образца.

**Общая методика получения олигонуклеотидов с мезонуклеотидными мезилфосфорамидными ( $\mu$ ) группами** [42]. Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали фосфитамидным методом с использованием автоматического синтезатора ДНК/РНК. Мезилфосфорамидную группу вводили в автоматическом режиме. Для этого после удаления 5'-DMTr-группы привитого к полимерному носителю нуклеозида или олигонуклеотида с помощью 3%-ного раствора дихлоруксусной кислоты в дихлорметане проводили конденсацию соответствующего фосфитамида (0.1 М раствор в безводном ацетонитриле) и эквипирование с использованием реагента Fast Deprotection Cap (Sigma-Aldrich, США), после чего осуществляли реакцию Штаудингера на твердой фазе с помощью 0.5 М раствора мезилазида в абсолютном ацетонитриле в течение 30 мин при комнатной температуре. После окончания автоматизированного синтеза олигонуклеотид отщепляли от полимерного носителя и деблокировали концентрированным (~25–30%) водным раствором аммиака (200 мкл на ~5 мг полимера) при 55°C в течение 16 ч. Аммиак упаривали в вакууме досуха с помощью вакуумного концентратора SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, США), добавляли 100 мкл 20 мМ ТЕАА, pH 7.0, отделяли супернатант от полимерного носителя, олигонуклеотид анализировали и выделяли с помощью электрофореза в ПААГ, как описано выше.

**Получение ионных наноконплексов олигонуклеотидов с мезопористыми наночастицами диоксида кремния, модифицированными остатками 1,2-этилендиаминна.** Синтез исходных мезопористых наночастиц кремнезема  $\text{mSiO}_2$  был проведен аналогично описанному в литературе [45]. Применяли следующие условия: 0.25 г бромиды цетилтриметиламмония (СТАВ) растворяли в 35 мл деионизованной воды при перемешивании, добавляли

1.5 мл концентрированного водного аммиака (28–30%), затем по каплям в течение 1 ч при непрерывном перемешивании прибавляли смесь *n*-гексана (5 мл) и тетраэтилортосиликата (1 мл). Температура реакции составляла 35°C. В результате перемешивания в течение 8 ч получали гомогенный белый коллоидный раствор. Осадок собирали центрифугированием и несколько раз промывали деионизованной водой и затем этанолом. Для удаления избытка СТАВ осадок диспергировали в растворе 1 М HCl (4 мл) и этанола (120 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 6 ч.

Для модификации поверхности остатками 1,2-этилендиамина наночастицы  $m\text{SiO}_2$  (50 мг) суспендировали в абсолютном этаноле (10 мл), перемешивали 10 мин, прибавляли 20 мкл 3-(2-аминоэтиламино)пропилдиметоксиметилсилана и кипятили с обратным холодильником в течение 6 ч. Затем осадок центрифугировали и несколько раз промывали этанолом. Продукт ресуспендировали в воде. Количество аминогрупп после модификации оценивали пикратным методом [46] по УФ-поглощению пикриновой кислоты в 5% ТЕА в этаноле при 358 нм ( $\epsilon$  14500).

Значения гидродинамического диаметра и  $\xi$ -потенциала полученных наночастиц определяли на приборе Zetasizer Nano ZS Plus (Malvern, Великобритания) при комнатной температуре и концентрации 0.2 мг/мл в деионизованной воде с использованием кюветы DTS1070 и усредняли по трем измерениям.

Комплексообразование с олигонуклеотидами проводили в водном растворе при pH 7.0, при котором  $\xi$ -потенциал  $m\text{SiO}_2$ –R2 положителен. Положительно заряженные частицы и отрицательно заряженный олигонуклеотид вступали в электростатическое взаимодействие, в результате чего образовывался ионный комплекс. Реакцию проводили при комнатной температуре с перемешиванием на шейкере. Перед реакцией наночастицы диспергировали в воде с помощью ультразвука в течение 1–2 мин. Время реакции составляло 2 ч. Количество наночастиц рассчитывали так, чтобы соотношение числа аминогрупп  $m\text{SiO}_2$ –R2 на одну модифицированную фосфатную группу олигонуклеотида составляло 5 : 1. По окончании реакции наночастицы отделяли центрифугированием и после удаления супернатанта дважды промывали водой. Емкость наноконцентрации по олигонуклеотиду определяли по УФ-поглощению при 260 нм содержащегося в супернатанте и промывках не вступившего в комплексообразование олигонуклеотида ( $\epsilon$  159200).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на мРНК

основного капсидного белка VP72 вируса африканской чумы свиней, в составе ионных наноконцентраций с мезопористыми наночастицами диоксида кремния, модифицированными остатками 1,2-этилендиамина, более эффективно снижают титр вируса АЧС в инфицированных клетках Vero, чем те же олигонуклеотиды, но без наночастиц. Это можно объяснить тем, что наноконцентрации более эффективно проникают в клетки по сравнению со свободными олигонуклеотидами (даже в присутствии Липофектамина 3000). Однако максимальное снижение количества вируса ( $\sim 1.0 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ ) наблюдалось только при комбинированном использовании двух наиболее эффективных АСО в концентрации 500 нМ. Следует отметить, что антисмысловые олигонуклеотиды, способные снижать репликацию вируса АЧС, до сих пор не были известны из опубликованной литературы. В то же время противовирусная активность исследованных наноконцентраций АСО, нацеленных на мРНК VP72, оказалась недостаточной для того, чтобы их можно было считать перспективными кандидатами для борьбы с АЧС. Тем не менее полученные данные могут служить отправной точкой для дальнейших исследований по повышению эффективности противовирусного действия наноконцентраций антисмысловых олигонуклеотидов в отношении вируса африканской чумы свиней.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е.А. Зеленцовой (Центр коллективного пользования “Масс-спектрометрические исследования” Международного томографического центра СО РАН) за регистрацию MALDI-TOF-масс-спектров олигонуклеотидов.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-515-05007\_Арм\_а), а также Министерства образования и науки Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета FSUS-2020-0035).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит описания выполненных кем-либо из авторов исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

А.В. Акобян и Е.А. Буракова внесли равный вклад в работу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Costard S., Mur L., Lubroth J., Sanchez-Vizcaino J.M., Pfeiffer D.U.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.030>
2. *Penrith M.-L., Vosloo W., Jori F., Bastos A.D.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 228–246. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.011>
3. *Sánchez-Vizcaino J.M., Mur L., Martínez-López B.* // *Vet. Microbiol.* 2013. V. 165. P. 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.030>
4. *Cisek A.A., Dąbrowska I., Gregorczyk K.P., Wyzewski Z.* // *Ann. Parasitol.* 2016. V. 62. P. 161–167. <https://doi.org/10.17420/ap6203.49>
5. *Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
6. *Oganesyan A.S., Petrova O.N., Korennoy F.I., Bardina N.S., Gogin A.E., Dudnikov S.A.* // *Virus Res.* 2013. V. 173. P. 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.009>
7. *Gallardo M.C., Reoyo A.T., Fernández-Pinero J., Iglesias I., Muñoz M.J., Arias M.L.* // *Porcine Health Manag.* 2015. V. 1. 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
8. *Zakaryan H., Revilla Y.* // *Vet. Microbiol.* 2016. V. 185. P. 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.016>
9. *Stephenson M.L., Zamecnik P.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. P. 285–288. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.285>
10. *Uhlmann E., Peyman A.* // *Chem. Rev.* 1990. V. 90. P. 543–584. <https://doi.org/10.1021/cr00102a001>
11. *De Mesmaeker A., Haener R., Martin P., Moser H.E.* // *Acc. Chem. Res.* 1995. V. 28. P. 366–374. <https://doi.org/10.1021/ar00057a002>
12. *Goodchild J.* // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 764. P. 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-188-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-188-8_1)
13. *Perry C.M., Balfour J.A.* // *Drugs.* 1999. V. 57. P. 375–380. <https://doi.org/10.2165/00003495-199957030-00010>
14. *Juliano R.L., Ming X., Nakagawa O.* // *Bioconjug. Chem.* 2012. V. 23. P. 147–157. <https://doi.org/10.1021/bc200377d>
15. *Parveen S., Misra R., Sahoo S.K.* // *Nanomedicine.* 2012. V. 8. P. 147–166. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
16. Design, Synthesis, Multifunctionalization and Bio-medical Applications of Multifunctional Mesoporous Silica-Based Drug Delivery Nanosystems. / Ed. Chen Y. Springer, 2016.
17. *Ryabchikova E.I., Chelobanov B.P., Parkhomenko R.G., Korchagina K.V., Basova T.V.* // *Micropor. Mesopor. Mater.* 2017. V. 248. P. 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.04.006>
18. *Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 1229–1234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>
19. *Crooke S.T.* // *Nucleic Acid Ther.* 2017. V. 27. P. 70–77. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0656>
20. *Wagner A., Bock C.T., Fechner H., Kurreck J.* // *Future Med. Chem.* 2015. V. 7. P. 1637–1642. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.114>
21. *Warren T.K., Shurtleff A.C., Bavari S.* // *Antiviral Res.* 2012. V. 94. P. 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.004>
22. *Keita D., Heath L., Albina E.* // *Antivir. Ther.* 2010. V. 15. P. 727–736. <https://doi.org/10.3851/IMP1593>
23. *Vasilyeva S.V., Grin I.R., Chelobanov B.P., Stetsenko D.A.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28. P. 1248–1251. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.02.007>
24. *Vasilyeva S.V., Petrova A.S., Shtil A.A., Stetsenko D.A.* // *J. Saudi Chem. Soc.* 2020. V. 24. P. 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2019.09.007>
25. *Vallet-Regí M., Rámila A., del Real R.P., Pérez-Pariante J.* // *Chem. Mater.* 2001. V. 13. P. 308–311. <https://doi.org/10.1021/cm0011559>
26. *Castillo R.R., Colilla M., Vallet-Regí M.* // *Expert. Opin. Drug Del.* 2017. V. 14. P. 229–243. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1211637>
27. *Song Y., Li Y., Xu Q., Liu Z.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 87–110. <https://doi.org/10.2147/IJN.S117495>
28. *Moreira A.F., Dias D.R., Correia I.J.* // *Micropor. Mesopor. Mater.* 2016. V. 236. P. 141–157. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.08.038>
29. *Xiao X., Liu Y., Guo M., Fei W., Zheng H., Zhang R., Zhang Y., Wei Y., Zheng G., Li F.* // *J. Biomater. Appl.* 2016. V. 31. P. 23–35. <https://doi.org/10.1177/0885328216637211>
30. *Guo Y., Sun J., Bai S., Jin X.* // *J. Biomater. Appl.* 2016. V. 31. P. 411–420. <https://doi.org/10.1177/0885328216653287>
31. *Manzano M., Ainaa V., Areán C.O., Balasa F., Cauda V., Colilla M., Delgado M.R., Vallet-Regí M.* // *Chem. Eng. J.* 2008. V. 137. P. 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.078>
32. *Wang J.G., Li F., Zhou H.J., Sun P.C., Ding D.T., Chen T.H.* // *Chem Mater.* 2009. V. 21. P. 612–620. <https://doi.org/10.1021/cm803124a>
33. *Gao C., Zheng H., Xing L., Shu M., Che S.* // *Chem. Mater.* 2010. V. 22. P. 5437–5444. <https://doi.org/10.1021/cm100667u>
34. *Cauda V., Argyo C., Schlossbauer A., Bein T.* // *J. Mater. Chem.* 2010. V. 20. P. 4305–4311. <https://doi.org/10.1039/B918590A>
35. *Szegedi A., Popova M., Goshev I., Mihály J.* // *J. Solid State Chem.* 2011. V. 184. P. 1201–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.03.005>
36. *Szegedi A., Popova M., Goshev I., Klébert S., Mihály J.* // *J. Solid State Chem.* 2012. V. 194. P. 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2012.05.030>
37. *Bahrami Z., Badiei A., Atyabi F.* // *Chem. Eng. Res. Des.* 2014. V. 92. P. 1296–1303. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.11.007>

38. *Rehman F., Ahmed K., Airoidi C., Gaisford S., Buanz A., Rahim A., Muhammad N., Volpe P.L.O.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2017. V. 72. P. 34–41.  
https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.040
39. *He Y., Luo L., Liang S., Long M., Xu H.* // *J. Biomater. Appl.* 2017. V. 32. P. 524–532.  
https://doi.org/10.1177/0885328217724638
40. *Xu P., Wang H., Tong R., Du Q., Zhong W.* // *Colloid Polym. Sci.* 2006. V. 284. P. 755–762.  
https://doi.org/10.1007/s00396-005-1428-9
41. *Eckstein F.* // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2009. V. 10. P. 117–121.  
https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.117
42. *Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Прохорова Д.В., Фокина А.А., Стеценко Д.А.* // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 644–649. [*Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 664–668.]  
https://doi.org/10.1134/S1068162017060024
43. *Matano Y., Ohkubo H., Honsho Y., Saito A., Seki S., Imahori H.* // *Org. Lett.* 2013. V. 15. P. 932–935.  
https://doi.org/10.1021/ol4000982
44. *Nikolaev V.A., Chiba J., Tomohiro T., Hatanaka Y.* // *Encyclop. Reag. Org. Synth.* 2015.  
https://doi.org/10.1002/047084289X.rm069.pub2
45. *Stöber W., Fink A., Bohn E.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1968. V. 26. P. 62–69.  
https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5
46. *Atherton E., Sheppard R.C., Ward P.* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1985. V. 10. P. 2065–2073.  
https://doi.org/10.1039/P19850002065
47. *Прохорова Д.В., Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Фокина А.А., Стеценко Д.А.* // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 45–50. [*Prokhorova D.V., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 38–42.]  
https://doi.org/10.1134/S1068162017010071

## Antiviral Activity of Nanocomplexes of Antisense Oligonucleotides Targeting the VP72 Protein in Vero Cells Infected with the African Swine Fever Virus

**A. V. Hakobyan\*, E. A. Burakova\*\*, \*\*\*, E. A. Arabyan\*, A. A. Fokina\*\*, \*\*\*, A. R. Kotsinyan\*, S. V. Vasilyeva\*\*\*\*, O. S. Zakaryan\*, and D. A. Stetsenko\*\*, \*\*\*, #**

\*Phone: +7 (383) 363-49-63; e-mail: d.stetsenko@nsu.ru

\*Institute of Molecular Biology of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, ul. Hasratyana 7, Yerevan, 0014 Armenia

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

\*\*\*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

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

Antiviral activity of antisense oligodeoxyribonucleotides with phosphorothioate or mesyl phosphoramidate internucleotidic groups targeting the main capsid protein VP72 mRNA of the African swine fever virus (ASFV), either in a free form with Lipofectamine 3000 transfection or in the form of ionic complexes with amino-modified mesoporous silicon dioxide nanoparticles, has been evaluated in Vero cells infected with ASFV. Relatively high cytotoxicity of oligonucleotide nanocomplexes for Vero cells at concentrations above 500 nM was detected. Two sequences of antisense oligonucleotides were identified, which reduced the virus titer by an order of magnitude at 500 nM. The antiviral effect of nanocomplexes exceeded that of free oligonucleotides in the presence of Lipofectamine 3000, which indicates a more efficient delivery of nanocomplexes to the cells. Antisense oligonucleotides able to reduce the replication of ASFV were hitherto unknown from the literature. The obtained data can be used as a starting point for further research on the development of oligonucleotide-based antiviral drugs against the African swine fever virus.

*Keywords: oligodeoxyribonucleotide, phosphorothioate, mesyl phosphoramidate, mesoporous silicon dioxide nanoparticles, inhibition of translation*



УДК 547.963.32:577.113.4:577.113.6

## НОВЫЕ ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ ПИРЕНИЛЬНЫЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ ОЛИГО(2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ) ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ микроРНК

© 2021 г. О. А. Семиколенова\*, \*\*, В. М. Голышев\*, Б. Х. Ким\*\*\*, А. Г. Веньямина\*, Д. С. Новопашина\*, \*\*, #

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

\*\*Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

\*\*\*Пхоханский университет науки и технологии, 77 Cheongam-ro, Hyogok-dong, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

Поступила в редакцию 14.09.2020 г.

После доработки 26.09.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

Созданы новые двухкомпонентные флуоресцентные зонды для детекции микроРНК на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), формирующие в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру из трех олигонуклеотидных дуплексов (3WJ – three-way junction) со вставкой <sup>Py</sup>A-модифицированного аденинового кластера, представляющего собой пентааденозиновый фрагмент, содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин. В качестве РНК-мишени выбрана микроРНК let-7a-3p, уровень которой в клетке коррелирует с возникновением и развитием онкологических заболеваний. Проведено сравнительное исследование термической стабильности и флуоресценции двухкомпонентных зондов на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), в составе которых имеется дезоксирибоаденозиновый (dAdA<sup>Py</sup>AdAdA) или (2'-О-метилрибо)аденозиновый фрагмент (A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>PyAA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>), содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин, и аналогичного олигодезоксирибонуклеотидного зонда. Обнаруженное изменение спектров флуоресценции созданных зондов при гибридизации с РНК-мишенью потенциально может быть использовано при разработке систем детекции микроРНК.

**Ключевые слова:** олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), флуоресцентные зонды, детекция РНК, 3WJ-структура, <sup>Py</sup>A-модифицированный пентаадениновый кластер, 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин

DOI: 10.31857/S0132342321020238

### ВВЕДЕНИЕ

Детекция и визуализация биомолекул *in vitro* и *in vivo*, в частности клеточных и внеклеточных РНК, необходимы для решения целого ряда задач молекулярной биологии и биомедицины, биохимии и клеточной биологии. Актуальной проблемой является повышение чувствительности систем, используемых для детекции и визуализации биомолекул, а именно увеличение соотношения сигнал/шум, а также повышение предела обнаружения [1, 2]. Флуоресцентные зонды представляют собой перспективную основу для создания высокочувствительных систем детекции биомолекул. Для сиквенс-специфической детекции нуклеи-

новых кислот используют флуоресцентные гибридационные зонды [3–5]. Интересным вариантом зондов являются тандемные флуоресцентные зонды, сигнал от которых возникает только при одновременной гибридизации компонентов зонда на НК-мишени за счет сближения пары флуорофоров. Флуоресцентные олигонуклеотидные зонды, содержащие остатки пирена в качестве флуорофора, являются перспективными инструментами для детекции нуклеиновых кислот благодаря высокой чувствительности флуоресценции пирена к окружению [6–9].

Одними из наиболее перспективных инструментов для детекции РНК являются флуоресцентные зонды на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов). Олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) обладают определенными преимуществами перед стандартно используемыми для создания олигонуклеотидных зондов олигодезоксирибонуклеотидами, а именно большей термической стабильностью дуплексов с комплементарной РНК,

Сокращения: 3WJ – three-way junction – структура из трех олигонуклеотидных дуплексов; <sup>Py</sup>A – модифицированный адениновый кластер – пентааденозиновый фрагмент, содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин; miR – микроРНК.

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-29; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

способностью разворачивать структурированную РНК, а также большей устойчивостью к действию нуклеаз [10, 11].

Относительно недавно был предложен новый вариант эксимерных зондов для детекции микроРНК, представляющий собой двухкомпонентный олигодезоксирибонуклеотидный зонд, способный образовывать в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру (3WJ – three-way junction), содержащую в одном из стеблей так называемые PyA-модифицированные адениновые кластеры в обеих цепях [12].

В данной работе мы провели дизайн, синтез и изучение свойств новых двухкомпонентных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), формирующих в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру. Каждый из компонентов зонда содержит PyA-модифицированный адениновый кластер, представляющий собой пентааденозиновый фрагмент, содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин.

В качестве РНК-мишени нами была выбрана микроРНК let-7a-3p (miR let-7a-3p). Уровень этой микроРНК в клетке коррелирует с возникновением и развитием онкологических заболеваний, в связи с этим она рассматривается как диагностический биомаркер онкологических заболеваний и является объектом исследований при создании новых усовершенствованных систем детекции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее были предложены и исследованы различные варианты пиренильных флуоресцентных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции РНК, в том числе биспиренильные линейные зонды [13–16], биспиренильные “молекулярные маяки” [17, 18] и тандемные биспиренильные зонды [19, 20].

В данной работе для детекции miR let-7a-3p нами были сконструированы двухкомпонентные зонды, формирующие в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру из трех олигонуклеотидных дуплексов (рис. 1). Каждый из компонентов зонда содержит PyA-модифицированный адениновый кластер, представляющий собой (2'-*O*-метилрибо)аденозиновый фрагмент ( $A^m A^m Py A A^m A^m$ ) (**Lmf + Rmf**) или дезоксирибоаденозиновый фрагмент ( $dAdA^{Py} AdAdA$ ) (**Lm + Rm**), содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин.

Для синтеза компонентов олигонуклеотидных зондов использовали специально полученный фосфитамид аденозина, содержащего пирен в 8-м положении гетероциклического основания. Для его введения автоматический твердофазный фосфитамидный синтез прерывали и проводили цикл присоединения модифицированного фосфитамидного звена в “ручном” варианте с использова-

нием 5-этилтиотетразола в качестве активатора. Время конденсации увеличивали до 30 мин. Проводили остальные стадии цикла в “ручном” варианте и продолжали синтез в автоматическом режиме.

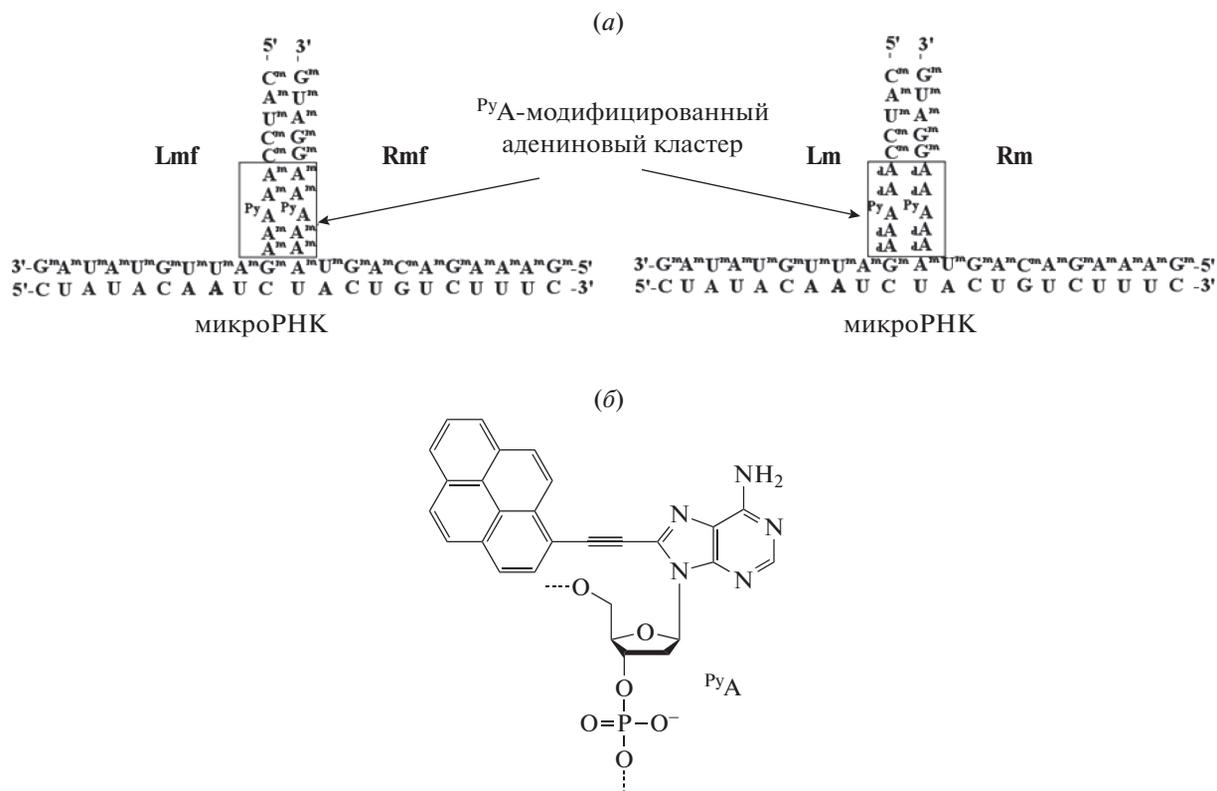
По окончании синтеза удаляли 5'-*O*-диметокситритильную группу и проводили деблокирование олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих PyA, в стандартных условиях. Модифицированные олигонуклеотиды выделяли методом препаративного гель-электрофореза. Строение конъюгатов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Таким образом были получены PyA-содержащие компоненты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) зондов (**Lmf + Rmf**) и (**Lm + Rm**), отличающиеся природой аденозинов в составе кластера, а также их олигодезоксирибонуклеотидные аналоги (**L + R**) (табл. 1). Для исследования влияния PyA на время удерживания при офВЭЖХ и термическую стабильность комплексов с РНК-мишенью были также синтезированы контрольные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (**Lmc и Rmc**), не содержащие PyA.

Гомогенность выделенных PyA-модифицированных олигонуклеотидов подтверждали методами офВЭЖХ (рис. 2) и электрофореза в денатурирующем 15%-ном ПААГ.

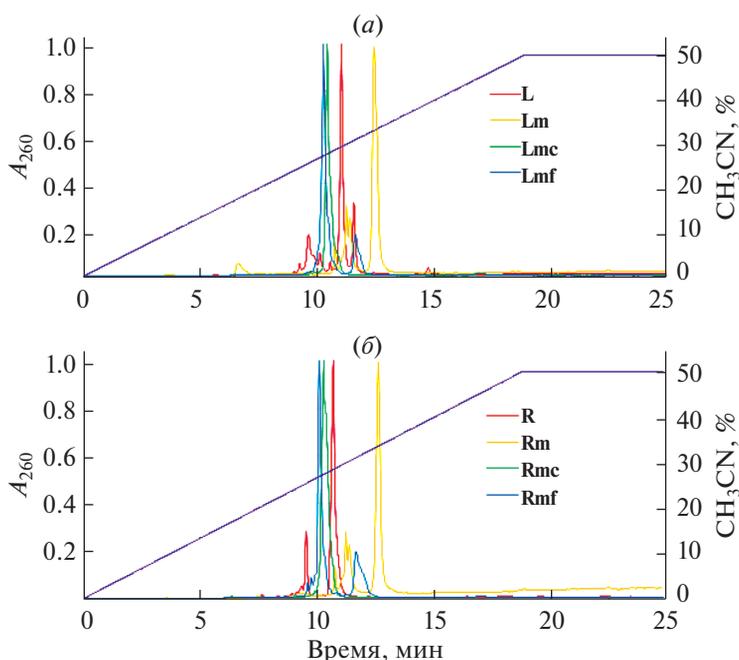
Введение модифицированного PyA в полностью 2'-*O*-метилированные олигорибонуклеотиды приводило к незначительному (0.3 мин) уменьшению времени удерживания при офВЭЖХ (**Lmf и Rmf**). Время удерживания модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов **L** и **R**, содержащих PyA, было незначительно больше (0.6–0.8 мин) времени удерживания их 2'-*O*-метилированных аналогов **Lmf** и **Rmf**. Дополнительная замена в **Lmf** и **Rmf** двух нуклеотидов с 3'- и 5'-стороны от PyA на дезоксирибоаденозины (**Lm** и **Rm**) приводила к увеличению времени удерживания (1.8–2.6 мин) при офВЭЖХ. Таким образом, химерные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (**Lm** и **Rm**), содержащие пентадесоксирибоаденозиновый фрагмент, являются наиболее гидрофобными.

В электронных спектрах поглощения всех конъюгатов, содержащих PyA, наблюдали максимум поглощения на длине волны 260 нм и два пика поглощения в области 360–430 нм. На рис. 3 приведены примеры спектров поглощения PyA-содержащих олигонуклеотидов. Два пика с максимумами на 380 и 420 нм соответствуют поглощению этинилпирена, введенного в аденин [12].

В спектрах флуоресценции компонентов олигодезоксирибонуклеотидных (**L** и **R**) и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) (**Lmf, Rmf, Lm** и **Rm**) зондов наблюдали флуоресценцию в диапазоне 440–460 нм, характерном для флуоресценции этинилпирена (рис. 4а–4в).



**Рис. 1.** (а) – Структуры 3WJ-комплексов, образующихся при гибридизации двухкомпонентных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) зондов (**Lmf + Rmf** и **Lm + Rm**) с РНК-мишенью. Py<sup>A</sup>-модифицированный адениновый кластер – (2'-*O*-метилрибо)аденозиновый фрагмент (A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>Py<sup>A</sup>AA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) (**Lmf + Rmf**) или дезоксирибоаденозиновый фрагмент (dAdA<sup>Py</sup>AdAdA) (**Lm + Rm**), содержащий в центре 8-(1-этилпирен)-дезоксирiboаденозин. N<sup>m</sup> – 2'-*O*-метилрибонуклеозид, dA – дезоксирибоаденозин. Обозначения компонентов зондов см. в табл. 1; (б) – структура 8-(1-этилпирен)-дезоксирiboаденозина (Py<sup>A</sup>).



**Рис. 2.** Нормализованные профили аналитической офВЭЖХ при анализе Py<sup>A</sup>-содержащих и контрольных (не содержащих Py<sup>A</sup>) олигонуклеотидов. (а) – **L, Lm, Lmc, Lmf**; (б) – **R, Rm, Rmc, Rmf**. Последовательности олигонуклеотидов см. в табл. 1. Условия: градиент концентрации 0–50% (20 мин) и 50% (5 мин) CH<sub>3</sub>CN в буфере, содержащем 0.02 М ТЕААс, рН 7.0, скорость потока – 100 мкл/мин.

Таблица 1. Последовательности и характеристики компонентов зондов, содержащих PyA, и контрольных олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов)

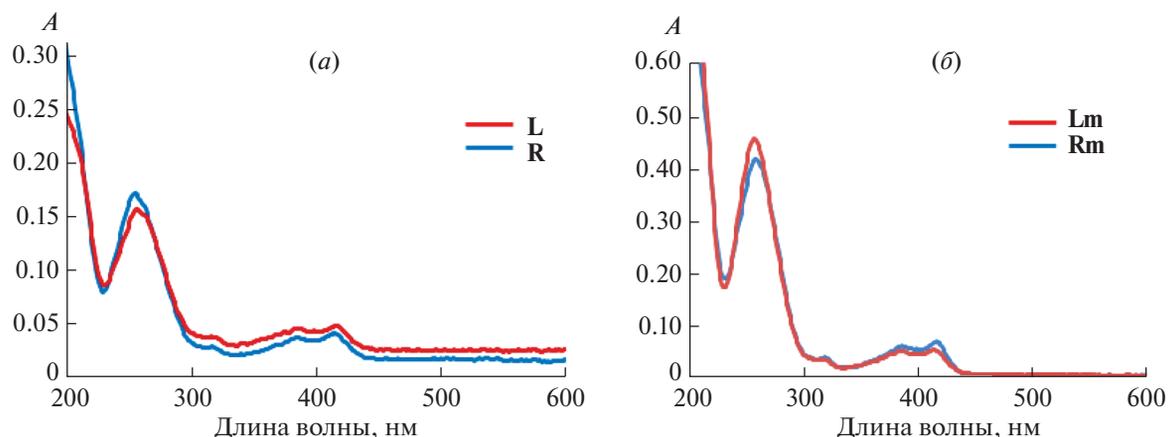
| Шифр       | Последовательность (5' → 3')  | Время удерживания*, мин | Молекулярная масса |              |
|------------|---|-------------------------|--------------------|--------------|
|            |   |                         | рассчитанная       | полученная** |
| <b>Lmf</b> | C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> Py <sup>m</sup> AA <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup>  | 10.2                    | 6858.7             | 6865.9       |
| <b>Rmf</b> | G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> Py <sup>m</sup> AA <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> | 10.1                    | 7367.0             | 7375.7       |
| <b>Lm</b>  | C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> dAdA <sup>m</sup> Py <sup>m</sup> AdAdAG <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup>   | 12.4                    | 6738.6             | 6746.1       |
| <b>Rm</b>  | G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> dAdA <sup>m</sup> Py <sup>m</sup> AdAdAG <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup>  | 12.7                    | 7247.0             | 7255.7       |
| <b>L</b>   | d(CATCCAA <sup>m</sup> AAAAGATTGTATAG)  | 11.0                    | 6334.3             | 6357.3***    |
| <b>R</b>   | d(GAAAAGACAGTAAA <sup>m</sup> AAAAGGATG)  | 10.7                    | 6770.6             | 6794.3***    |
| <b>Lmc</b> | C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup>  | 10.5                    | 6663.4             | 6668.6       |
| <b>Rmc</b> | G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup>                                 | 10.4                    | 7171.8             | 7178.6       |

\* По данным офВЭЖХ, условия см. в "Эксперим. части".

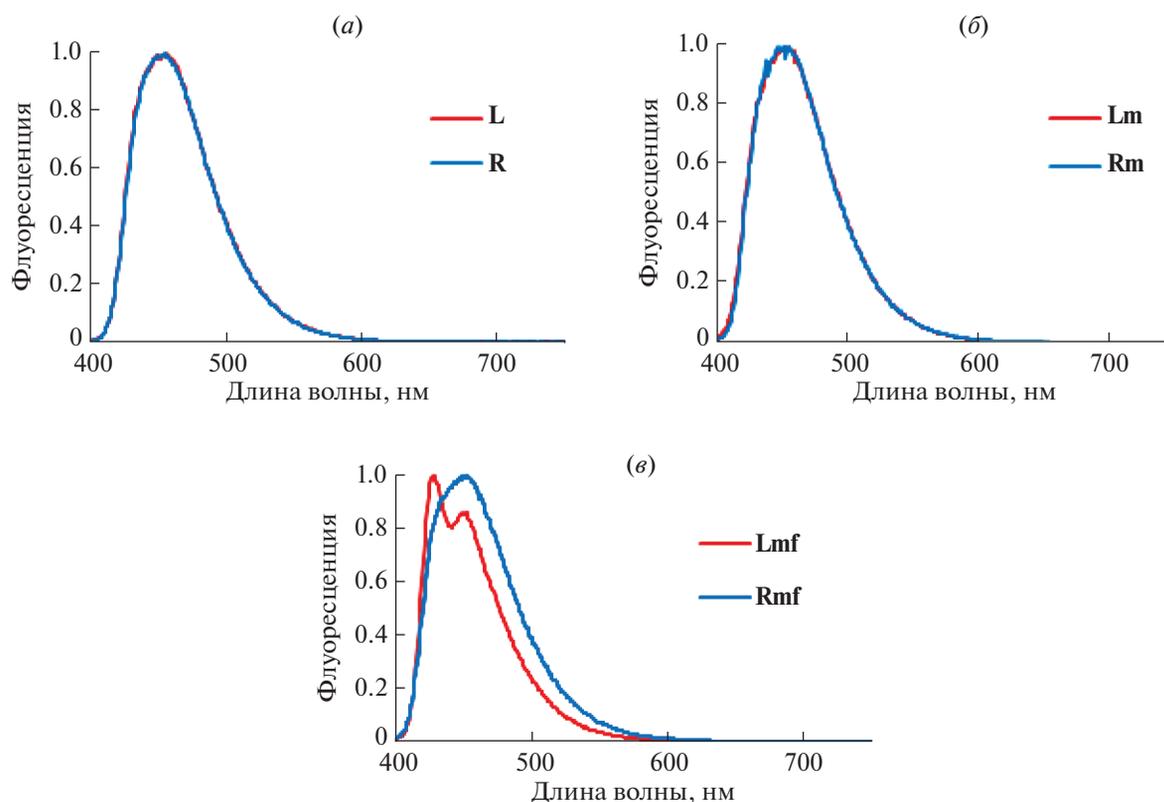
\*\* По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

\*\*\* Содержит дополнительно ион Na<sup>+</sup>.

N<sup>m</sup> – 2'-O-метилрибонуклеозид; d – олигодезоксирибонуклеотид; dA – дезоксирибоаденозин в составе олиго(2'-O-метилрибонуклеотида); PyA – 8-(1-этилнилпирен)-дезоксирибоаденозин.



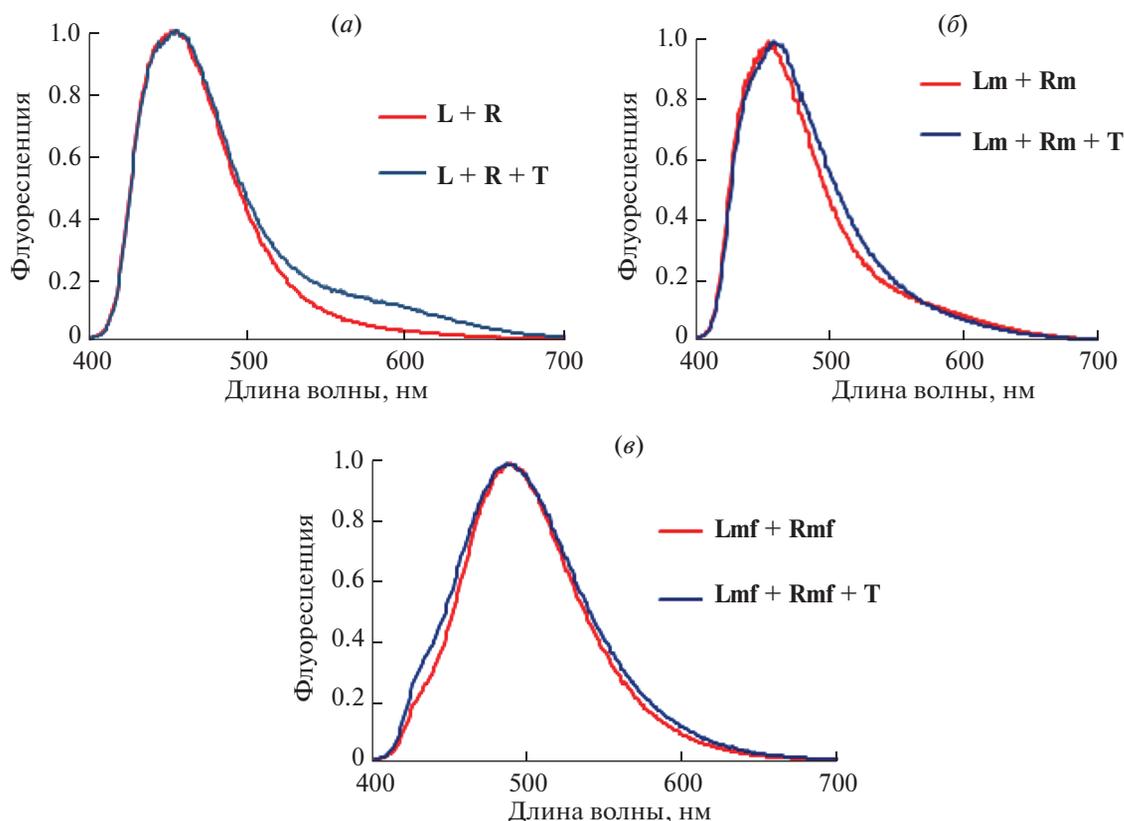
**Рис. 3.** Спектры поглощения водных растворов  $^{PyA}$ -модифицированных олигонуклеотидов: (а) – олигодезоксирибонуклеотидов (**L** и **R**), (б) – олиго-(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**Lm** и **Rm**). Концентрация олигонуклеотидов 10 мкМ, температура 25°C.



**Рис. 4.** Нормализованные спектры флуоресценции зондов: (а) – олигодезоксирибонуклеотидных (**L** и **R**); (б) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) (**Lm** и **Rm**); (в) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) (**Lmf** и **Rmf**). Условия: 2 мкМ олигонуклеотиды; длина оптического пути 4 мм; 0.1 М NaCl, 50 мМ Трис-НСl буфер (рН 7.5), 10 мМ  $MgCl_2$ ; длина волны возбуждения 385 нм; температура 25°C.

Во флуоресцентном спектре олигонуклеотида **Lmf** – компонента полностью 2'-*O*-метилированного зонда – регистрировали дополнительный пик на меньшей длине волны (рис. 4в). Проанализировав вероятность образования внутри- и

межмолекулярных комплексов для этой последовательности, мы выяснили, что этот олигонуклеотид способен образовывать самокомплементарные комплексы, в которых остатки  $^{PyA}$  в составе разных цепей будут расположены на различном



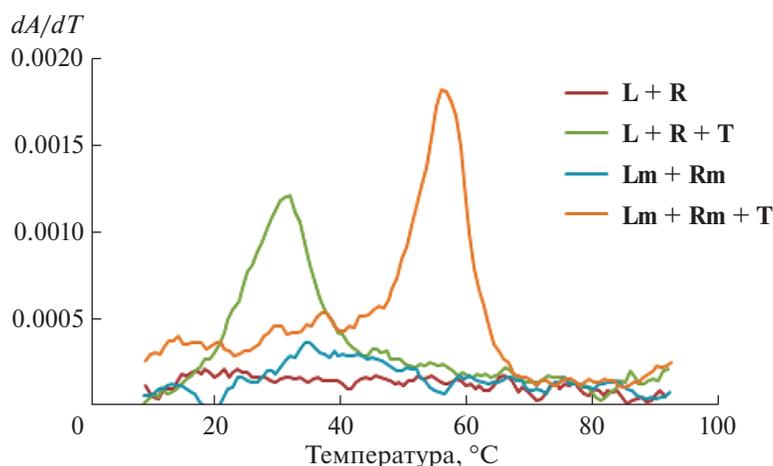
**Рис. 5.** Нормализованные спектры флуоресценции двухкомпонентных зондов и их комплексов с РНК-мишенью. (а) – Олигодезоксирибонуклеотидный зонд (**L + R**) и его комплекс с РНК-мишенью (**L + R + T**); (б) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидный) зонд (**Lm + Rm**) и его комплекс с РНК-мишенью (**Lm + Rm + T**); (в) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидный) зонд (**Lmf + Rmf**) и его комплекс с РНК-мишенью (**Lmf + Rmf + T**). Т – РНК-мишень miR let-7a-3p. Условия: 2 мкМ олигонуклеотиды и РНК-мишень; длина оптического пути 4 мм; 50 мМ Трис-НСl буфер (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 М NaCl; длина волны возбуждения 385 нм; температура 25°С.

расстоянии друг от друга в составе комплекса, что и может быть причиной возникновения второго пика флуоресценции. Аналогичный эффект наблюдали в работе Cummins et al. [10] при исследовании различных типов комплексов с <sup>Py</sup>A-модифицированными адениновыми кластерами.

Ранее было продемонстрировано, что двухкомпонентные олигодезоксирибонуклеотидные зонды, формирующие 3WJ-комплексы с РНК-мишенью и содержащие <sup>Py</sup>A-модифицированные адениновые кластеры в обеих цепях, обладают уникальными флуоресцентными свойствами [12]. При гибридизации с РНК пирен-модифицированные аденины (<sup>Py</sup>A) в составе <sup>Py</sup>A-модифицированных адениновых кластеров взаимодействуют между собой с образованием структуры с отличными от исходных олигонуклеотидных компонентов флуоресцентными свойствами, что позволяет проводить детекцию РНК-мишеней.

Нами были получены спектры флуоресценции двухкомпонентных зондов и их комплексов с РНК-мишенью (рис. 5). Анализируя спектры флуоресценции двухкомпонентных зондов в отсутствие

РНК-мишени и при добавлении РНК-мишени, можно заключить, что в случае олигодезоксирибонуклеотидного зонда (**L + R**) в присутствии РНК-мишени в спектрах увеличивается интенсивность излучения флуоресценции в более длинноволновой области относительно флуоресценции исходных компонентов зонда (рис. 5а). Аналогичные изменения спектра наблюдали и в работах [12, 21, 22]. В случае зонда (**Lm + Rm**) в спектрах флуоресценции с РНК-мишенью таких изменений не регистрировали, но при этом максимум основного пика несколько сдвигался в более длинноволновую область (с 453 до 460 нм) (рис. 5б). В случае зонда (**Lmf + Rmf**) в спектрах флуоресценции как в отсутствие, так и в присутствии РНК-мишени максимум флуоресценции регистрировали в еще более длинноволновой области при 495 нм, при этом в спектрах флуоресценции зонда в присутствии РНК-мишени регистрировали относительное увеличение интенсивности флуоресценции в области 420–440 нм (рис. 5в). Появление отличий в спектрах флуоресценции при гибридизации двухкомпонентных зондов с РНК-мишенью позволяет го-



**Рис. 6.** Дифференциальные кривые термической денатурации компонентов тандемных зондов (**L + R**, **Lm + Rm**) и их комплексов с РНК-мишенью (**L + R + T**, **Lmf + Rmf + T**). Условия термической денатурации: буфер (25 мМ Трис-НСI (pH 7.2), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>), концентрации олигонуклеотидных компонентов 1 мкМ. Т – РНК-мишень miR let-7a-3p.

ворить о потенциальной возможности разработки систем детекции РНК с использованием этих зондов.

Методом термической денатурации была исследована стабильность комплексов двухкомпонентных зондов, содержащих <sup>Py</sup>A-модифицированный адениновый кластер, с РНК-мишенью. Для зондов в отсутствие мишени не наблюдали значительных изменений в оптической плотности растворов при изменении температуры, что, вероятно, свидетельствует об отсутствии взаимодействия между компонентами зонда (рис. 6).

Температура плавления комплекса зонда, состоящего из олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**Lm + Rm**), с РНК-мишенью составила 57.3°C и была выше температуры аналогичного комплекса зонда, состоящего из олигодезоксирибонуклеотидов (**L + R**), с РНК-мишенью, которая составила 39.1°C, что согласуется с литературными данными [23]. Видимо, изменение максимума флуоресценции зонда (**Lm + Rm**) при гибридизации с РНК, по сравнению с зондом (**L + R**) (рис. 5а, 5б), может быть частично объяснено более высокой стабильностью комплекса. Другим объяснением отличий в спектрах флуоресценции может быть другая конформация химерного 2'-*O*-метил-РНК/ДНК-дуплекса (скорее всего, промежуточная форма между А- и В-формами двойной спирали), содержащего <sup>Py</sup>A-модифицированный адениновый кластер, по сравнению с аналогичным ДНК-дуплексом (близкая к В-форме двойной спирали).

Таким образом, нами продемонстрирована способность двухкомпонентных зондов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих <sup>Py</sup>A-модифицированный адениновый кластер, формировать

более стабильные 3WJ-комплексы с РНК-мишенью, чем аналогичные олигодезоксирибонуклеотидные зонды.

Предложенные в данной работе новые двухкомпонентные флуоресцентные зонды на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), формирующие с РНК-мишенью 3WJ-структуру, изменяют свои флуоресцентные свойства при формировании комплекса с РНК-мишенью и в перспективе могут быть использованы в качестве зондов для детекции РНК-мишеней, в том числе микроРНК. Требуется дополнительное исследование влияния структуры зондов, а именно положения <sup>Py</sup>A в составе кластера и протяженности самого кластера, на их свойства для улучшения специфичности флуоресцентного сигнала и увеличения чувствительности к РНК-мишени.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и оборудование.** В работе были использованы следующие реактивы: перхлорат натрия, дисукцинимидилкарботат, пиренметиламин, *N*-метилимидазол (Acros Organics, США); 4,4'-диметокситритилхлорид (Alfa Aesar, США); 5-этилтио-1*H*-тетразол (Biosset, Россия); 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамид, полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном – 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсиллил-*N*2-ацетилгуанозин-CPG, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсиллил-уридин-CPG, фосфитамиды *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-метилрибонуклеозидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсиллил-рибонуклеозидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-дезокситрибонуклеоти-

дов (ChemGenes, США); краситель “Stains-all”, персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид, 2,6-лутидин, Трис-гидрокси-метиламинометан (Fluka, Швейцария); мочевины, 40%-ный водный раствор метиламина (Merck, Германия); молекулярные сита “Trap-Pac™ Molecular Sieve Bag” 3 Å (Millipore, США); пиридин, ацетон, тетрагидрофуран, 15%-ный раствор уксусного ангидрида в тетрагидрофуране (PanReac, Испания); ксиленианол FF, бромфеноловый синий, *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусная кислота (Serva, Германия); триэтиламин, триэтиламинтригидрофторид, гексаметилендиамин, этокситриметилсилан (Sigma-Aldrich, США); хлористый метилен, йод кристаллический, ацетонитрил (Криохром, Россия).

*N*6-бензоил-5'-*O*-[бис(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-2'-деоксиаденозин был синтезирован и выделен в лаборатории профессора Б.Х. Кима (В.Н. Kim, Пхоханский университет науки и технологии, Пхохан, Южная Корея) по методике Hwang et al. [24].

Олигонуклеотиды были получены на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биосет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом в условиях, оптимизированных нами для этого прибора. Все водные растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США).

Строение полученных олигонуклеотидов и конъюгатов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра REFLEX III (Bruker Daltonics, Германия) (Центр коллективного пользования Центр масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Для анализа возможности образования внутри- и межмолекулярных комплексов олигонуклеотидов использовали программное обеспечение OligoAnalyzer 3.1. (Integrated DNA Technologies, США).

**Расчет коэффициентов молярного поглощения.** Оптическую плотность растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Молярные коэффициенты поглощения немодифицированных олигонуклеотидов при 260 нм рассчитывали по данным работы Marti et al. [19]. Значения молярных коэффициентов поглощения для 2'-*O*-метилрибонуклеотидов принимали равными соответствующим молярным коэффициентам поглощения для рибонуклеотидов. При расчете коэффициентов молярного поглощения олигонуклеотидов, содержащих <sup>32</sup>P, влияние пирена не учитывали.

**Регистрация спектров флуоресценции.** Флуоресценцию <sup>32</sup>P-содержащих олиго(2'-*O*-метилрибону-

клеотидов) и олигодезоксирибонуклеотидов регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc., США) в кварцевых кюветках (длина оптического пути 4 мм) при комнатной температуре в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мкМ NaCl или в буфере, содержащем 10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 0.1 М NaCl, 1 мМ трилон Б, при концентрации олигонуклеотидных компонентов 2 мкМ.

**Регистрация спектров поглощения.** Поглощение <sup>32</sup>P-содержащих олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и олигодезоксирибонуклеотидов регистрировали на спектрофотометре BioSpectrometer (Eppendorf, Германия) в кварцевых кюветках (длина оптического пути 1 мм) при комнатной температуре при концентрации олигонуклеотидных компонентов 10 мкМ в воде.

**Аналитическая обращенно-фазовая хроматография.** Аналитическую оФВЭЖХ проводили на жидкостном микроколоночном хроматографе Милихром А-02 (ЭкоНова, Россия) с использованием колонки ProntoSil (75 × 2 мм) в градиенте концентрации 0–50% (20 мин) и 50% (5 мин) CH<sub>3</sub>CN в буфере, содержащем 0.02 М ТЕААс, рН 7.0, скорость потока 100 мкл/мин. Измерения проводили на трех длинах волн 260, 300 и 346 нм спектрофотометрического детектора хроматографа (Альфахром, Россия) при 40°C. Полученные данные обрабатывали в программе Мультихром ОС (ЭкоНова, Россия) и в Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

**Термическая денатурация дуплексов.** Дифференциальные кривые термической денатурации дуплексов были получены на установке с терморегулируемой оптической кюветкой на базе спектрофотометра Cary 300 BioMelt (Varian Inc., Австралия). Изменение температуры проводили со скоростью 0.5°C/мин. Детекцию поглощения осуществляли на двух длинах волн (260 и 270 нм). Обработку кривых термической денатурации и ренатурации проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, США). Температуры плавления были определены как максимумы первых производных кривых плавления.

**Синтез *N*6-бензоил-5'-*O*-[бис(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-3'-{бис[1-(метилэтил)фосфорамидил]цианоэтил}-2'-деоксиаденозина (<sup>32</sup>P).** Синтез проводили по аналогии с работой Ji et al. [25] с небольшими изменениями. К раствору 200 мг (0.23 ммоль) соединения (*N*6-бензоил-5'-*O*-[бис(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-2'-деоксиаденозина) в 0.7 мл хлористого метилена добавляли 69 мкл (0.40 ммоль) *N,N*-диизопропилэтиламина и раствор, содержащий 44.9 мг (0.35 ммоль) 5-этилтиотетразола в 0.28 мл CH<sub>3</sub>CN<sub>абс</sub>. Затем добавляли 144 мкл (0.45 ммоль) 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамида. За про-

хождением реакции следили с помощью ТСХ (система гексан : этилацетат, 1 : 2). По окончании реакции реакционную смесь растворяли в EtOAc (3–4 мл), отделяли раствор от осадка, образовавшегося в результате реакции, и переносили в пробирку на 50 мл, промывали осадок этилацетатом (6 мл × 4) и экстрагировали объединенный раствор насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Водный слой трижды промывали этилацетатом, объединенные органические слои сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали досуха. Продукт выделяли из реакционной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле (230–400 меш, 60 Å) (Sigma, США). Смесь, растворенную в 2 мл 50%-ного раствора этилацетата в гексане, наносили на колонку. Проводили элюцию в градиенте концентрации этилацетата в гексане (50–60%) и упаривали соответствующие фракции. R<sub>f</sub> 0.76, система ТСХ гексан : этилацетат, 1 : 2. Выход фосфитамида <sup>32</sup>P составил 56%.

**Получение <sup>32</sup>P-модифицированных олигонуклеотидов (L, R, Lm, Rm, Lmf, Rmf) в “ручном” варианте твердофазного фосфитамидного синтеза.** Полимер-связанный 3'-концевой фрагмент олигонуклеотида, полученный автоматическим твердофазным фосфитамидным методом, переносили из реактора в пробирку на 1.5 мл и добавляли раствор, содержащий 22 мг фосфитамида <sup>32</sup>P в смеси 100 мкл хлористого метилена и 100 мкл CH<sub>3</sub>CN<sub>abc</sub> (0.1 М). Затем добавляли 200 мкл 0.25 М раствора активатора 5-этилтиотетразола в CH<sub>3</sub>CN<sub>abc</sub>, перемешивали 30 мин при 37°C, раствор отбирали. Полимерный носитель промывали CH<sub>3</sub>CN<sub>abc</sub> (200 мкл × 3) и абсолютным тетрагидрофураном (200 мкл × 2).

К полимер-связанному олигонуклеотиду добавляли 100 мкл CrA (10%-ный уксусный ангидрид, 10%-ный 2,6-лутидин в THF), затем 100 мкл CrB (16%-ный N-метилимидазол в THF), перемешивали 5 мин при 37°C, раствор отбирали. Повторяли процедуру еще раз. Полимерный носитель промывали тетрагидрофураном (200 мкл × 2). Затем добавляли 200 мкл раствора окислителя (0.02 М I<sub>2</sub> в THF : Py : H<sub>2</sub>O, 45 : 0.5 : 4.5 (v/v/v)), перемешивали 5 мин при 37°C, раствор отбирали. Полимерный носитель промывали тетрагидрофураном (200 мкл × 3) и хлористым метиленом (200 мкл × 2).

Для удаления 5'-O-диметокситритильной группы добавляли 300 мкл деблокирующего агента (3%-ный раствор дихлоруксусной кислоты в хлористом метилене), перемешивали 1 мин, раствор отбирали. Повторяли процедуру еще 2 раза. Полимер промывали хлористым метиленом (200 мкл × 2) и ацетоном (200 мкл × 2). Полимер высушивали, помещали в реактор и продолжали автоматический твердофазный фосфитамидный синтез. Конъюгаты деблокировали в стандартных условиях. Выделение конъюгатов проводили в 15%-ном ПААГ (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид, 29 : 1) в денатурирующих условиях (8 М мочевины, 50 мМ Трис-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.3, 0.1 М трилон Б). Последовательности и характеристики конъюгатов приведены в табл. 1.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ха Юнг Ли (Ha Jung Lee) (Пхоханский университет науки и технологии, Пхохан, Южная Корея) за синтез и выделение N<sup>6</sup>-бензоил-5'-O-[*bis*(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-2'-деоксиаденозина) и к.х.н. А.А. Черноносову (Центр масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за регистрацию масс-спектров олигонуклеотидов и их конъюгатов.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта базового бюджетного финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № AAAA-A17-117020210021-7.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bao G., Rhee W.J., Tsourkas A. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2009. V. 11. P. 25–47.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124920>
2. Guo J., Ju J., Turro N.J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 3115–3125.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5526-x>
3. Hwang G.T. // *Molecules.* 2018. V. 23. P. 124.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23010124>
4. Boutorine A.S., Novopashina D.S., Krasheninina O.A., Nozeret K., Venyaminova A.G. // *Molecules.* 2013. V. 18. P. 15357–15397.  
<https://doi.org/10.3390/molecules181215357>
5. Wang K., Huang J., Yang X., He X., Liu J. // *Analyst.* 2013. V. 138. P. 62–71.  
<https://doi.org/10.1039/c2an35254k>
6. Birks J.B., Dyson D.J., Munro I.H. // *Proc. R. Soc. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 1963. V. 275. P. 575–588.  
<https://doi.org/10.1098/rspa.1963.0187>
7. Krasheninina O.A., Novopashina D.S., Apartsin E.K., Venyaminova A.G. // *Molecules.* 2017. V. 22. P. 2108.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22122108>

8. *Astakhova I.V., Korshun V.A., Wengel J.* // Chem. Eur. J. 2008. V. 14. P. 11010–11026.  
<https://doi.org/10.1002/chem.200801077>
9. *Astakhova I.K., Lindegaard D., Korshun V.A., Wengel J.* // Chem. Commun. 2010. V. 46. P. 8362–8364.  
<https://doi.org/10.1039/c0cc03026k>
10. *Cummins L.L., Owens S.R., Risen L.M., Lesnik E.A., Freier S.M., McGee D., Guinosso C.J., Cook P.D.* // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 2019–2024.  
<https://doi.org/10.1093/nar/23.11.2019>
11. *Boutorine A.S., Venyaminova A.G., Repkova M.N., Sergueyeva Z.A., Pyshnyĭ D.V.* // Biochimie. 1994. V. 76. P. 23–32.  
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90059-0)
12. *Kim K.T., Heo W., Joo T., Kim B.H.* // Org. Biomol. Chem. 2015. V. 13. P. 8470–8478.  
<https://doi.org/10.1039/C5OB01159K>
13. *Sakamoto T., Kobori A., Murakami A.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 2590–2593.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.040>
14. *Waki R., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A.* // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 4204–4206.  
<https://doi.org/10.1039/c0cc04639f>
15. *Новопашина Д.С., Тоцкая О.С., Холодарь С.А., Мещанинова М.И., Веньяминова А.Г.* // Биоорг. химия. 2008. Т. 34. С. 671–682. [*Novopashina D.S., Totskaya O.S., Kholodar S.A., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. P. 602–612.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162008050105>
16. *Krasheninina O.A., Novopashina D.S., Lomzov A.A., Venyaminova A.G.* // Chembiochem. 2014. V. 15. P. 1939–1946.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.201402105>
17. *Крашенинина О.А., Фишман В.С., Новопашина Д.С., Веньяминова А.Г.* // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 261–272. [*Krasheninina O.A., Fishman V.S., Novopashina D.S., Venyaminova A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 259–269.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162017030086>
18. *Pasternak A., Kierzek E., Pasternak K., Fratzczak A., Turner D.H., Kierzek R.* // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 1249–1258.  
<https://doi.org/10.1021/bi701758z>
19. *Marti A.A., Li X., Jockusch S., Li Z., Raveendra B., Kalachikov S.* // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 3161–3168.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl406>
20. *Krasheninina O.A., Lomzov A.A., Fishman V.S., Novopashina D.S., Venyaminova A.G.* // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 2244–2250.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.042>
21. *Ro J.J., Lee H.J., Kim B.H.* // Chem. Commun. 2018. V. 54. P. 7471–7474.  
<https://doi.org/10.1039/C8CC03982H>
22. *Seo Y.J., Ryu J.H., Kim B.H.* // Org. Lett. 2005. V. 7. P. 4931–4933.  
<https://doi.org/10.1021/ol0518582>
23. *Inoue H., Hayase Y., Imura A., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E.* // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 6131–6148.  
<https://doi.org/10.1093/nar/15.15.6131>
24. *Hwang G.T., Seo Y.J., Kim B.H.* // Tetrahedron Lett. 2005. V. 46. P. 1475–1477.  
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.01.015>
25. *Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., Tang X.* // Angew. Chemie Int. Ed. 2016. V. 55. P. 2152–2156.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201510921>

## New Two-Component Pyrene Probes on the Basis of Oligo(2'-O-Methylribonucleotides) for microRNA Detection

**O. A. Semikolenova<sup>\*, \*\*</sup>, V. M. Golyshev<sup>\*</sup>,  
B. H. Kim<sup>\*\*\*</sup>, A. G. Venyaminova<sup>\*</sup>, and D. S. Novopashina<sup>\*, \*\*, #</sup>**

<sup>#</sup>Phone: +7 (383) 363-51-29; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

<sup>\*</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*</sup>Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Pohang University of Science and Technology (POSTECH),

77 Cheongam-ro, Hyogok-dong, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

New two-component pyrene probes on the basis of oligo(2'-O-methylribonucleotides) for microRNA detection were obtained. They can form a three-way junction structure (3WJ) with RNA-target and contain the <sup>Py</sup>A-modified adenine clusters with 8-(1-ethynylpyrene)-deoxyriboadenosine in the center of both components. We have chosen microRNA let-7a-3p as RNA-target because correlation of its concentration in cells with cancer's appearance and progression. Comparative study of thermal stability and fluorescence properties of probes on the basis of oligo(2'-O-methylribonucleotides) contain deoxyriboadenosine (dAdA<sup>Py</sup>AdAdA) or (2'-O-methylribo)adenosine (A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>PyAA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) fragment with 8-(1-ethynylpyrene)-deoxyriboadenosine in the center, and of similar probe on the basis of oligodeoxyribonucleotide have been carried out. The changes of fluorescence spectra of two-component probes upon hybridization with RNA-target have been demonstrated and can be potentially used for design of new microRNA detection system.

*Keywords:* oligo(2'-O-methylribonucleotides), fluorescent properties, RNA detection, 3WJ-structure, <sup>Py</sup>A-modified adenine cluster, 8-(1-ethynylpyrene)-deoxyriboadenosine



УДК 577.21

## ДИЗАЙН И ВАЛИДАЦИЯ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГАНКИРИНА В ПЕЧЕНИ МЫШИ

© 2021 г. Т. А. Приказчикова\*, Т. О. Абакумова\*, О. В. Сергеева\*.,# , Т. С. Зацепин\*.,\*\*

\*Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205 Москва, Большой б-р, 30, стр. 1

\*\*ФГБУН “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”,  
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 04.10.2020 г.

Несмотря на успехи последних лет в лечении гепатоклеточной карциномы и других онкологических заболеваний печени, разработка новых подходов к терапии этих заболеваний остается актуальной задачей. Применение терапевтических нуклеиновых кислот дает возможность подавлять в течение длительного времени “сложные” мишени, а также успешно реализовывать комплексную терапию с малыми молекулами и антителами. Одной из привлекательных мишеней для лечения гепатоклеточной карциномы является ганкирин – белок, активно участвующий в росте, пролиферации и инвазии клеток, в том числе опухолевых. Было показано, что уровень ганкирина повышается в процессе канцерогенеза и играет значительную роль в росте и метастазировании опухоли. В рамках данной работы нами были проведены дизайн, синтез и валидация *in vitro* и *in vivo* малых интерферирующих РНК (siРНК) для подавления экспрессии ганкирина. По результатам трансфекции клеток и последующей оценки количества мРНК ганкирина в гепатоцитах мыши AML12 были отобраны три из семи синтезированных siРНК (степень ингибирования до 80%). Согласно результатам моделирования вторичной структуры мРНК ганкирина мыши, данные siРНК комплементарны фрагментам мРНК, содержащим в своей структуре одновременно одно- и двуцепочечные участки. Эффективность отобранных siРНК была также изучена в экспериментах на мышцах линии BALB/C, было показано, что siРНК в составе липидных частиц подавляли экспрессию мРНК ганкирина более чем на 90% при однократной инъекции 0.2 мг/кг. Полученные siРНК могут быть использованы для изучения роли ганкирина в развитии ряда онкологических и метаболических заболеваний на моделях животных.

**Ключевые слова:** малые интерферирующие РНК, печень, ганкирин, РНК-интерференция

DOI: 10.31857/S0132342321020226

### ВВЕДЕНИЕ

Разнообразные злокачественные образования печени входят в десятку самых распространенных онкологических заболеваний. Высокая функциональность печени даже на поздних стадиях развития гепатоклеточной карциномы, холангиокарциномы и других онкологических заболеваний затрудняет своевременную диагностику, поэтому часто единственным вариантом лечения остается резекция и пересадка печени. Несмотря на успехи хирургических подходов, лекарственная терапия предпочтительна из-за меньших рисков для пациентов.

При развитии рака печени изменяется экспрессия многих генов, которые могут выступать в

качестве потенциальных мишеней для терапии и диагностики [1, 2]. Одним из основных онкогенов, вызывающих повышенную пролиферацию гепатоцитов, является малая субъединица 26S протеасомы, отвечающей за расщепление белков – ганкирин. Ганкирин состоит из семи тандемно расположенных аминокислотных повторов (анкириновых повторов) и синтезируется практически во всех эукариотических клетках [3]. Повышенный уровень ганкирина в гепатоцитах мыши приводит к увеличению деградации супрессоров канцерогенеза, в том числе семейства транскрипционных факторов СЕВР. Также увеличение уровня ганкирина приводит к индукции гемангиомы за счет активации белка HIF-1, что свидетельствует о роли ганкирина в ответе на гипоксию в дополнение к его функциям онкобелка [4]. Все перечисленные свойства делают ганкирин привлекательным маркером и потенциальной мишенью для терапии гепатоклеточной карциномы.

Сокращения: siРНК – малые интерферирующие РНК; микроРНК – малые некодирующие РНК.

# Автор для связи: (тел.: +7 (926) 388-08-65; эл. почта: o.sergeeva@skoltech.ru).

В настоящее время разрабатываются различные подходы к снижению экспрессии ганкирина в раковых клетках. Известны малые молекулы и пептиды, ингибирующие связывание ганкирина с рядом белков-партнеров [5, 6], однако эти ингибиторы обладают ограниченной эффективностью за счет блокирования только части функций ганкирина. Альтернативным решением является подавление экспрессии мРНК ганкирина с использованием терапевтических нуклеиновых кислот [7]. Одним из подходов к регуляции количества мРНК, а следовательно, и белка в клетке является метод РНК-интерференции [8].

На сегодняшний день ряд препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов и малых интерферирующих РНК (siРНК) уже одобрен для применения в клинической практике при лечении наследственных метаболических заболеваний. Эти препараты характеризуются высоким терапевтическим индексом и эффективностью, а также пролонгированностью действия. Успехи применения терапевтических нуклеиновых кислот для лечения онкологических заболеваний пока более скромные, однако они активно используются для валидации новых мишеней [9, 10]. Синтетические siРНК представляют собой короткие РНК-дуплексы, способные активировать механизм РНК-интерференции. Антисмысловая цепь siРНК связывается с белком Ago2, образуя комплекс RISC, который в свою очередь взаимодействует с целевой мРНК, вызывая ее деградацию и ингибирование трансляции [11]. siРНК обладают высокой селективностью к мРНК-мишеням, что делает siРНК привлекательным инструментом для терапии [12]. Несмотря на развитие ряда инструментов для дизайна siРНК [13–16], создание активных siРНК остается сложной задачей.

В рамках данной работы нами были осуществлены дизайн, синтез и тестирование siРНК, подавляющих экспрессию гена ганкирина на уровне мРНК путем РНК-интерференции. На основании анализа вторичной структуры мРНК ганкирина были выбраны сайты связывания siРНК и проверена эффективность siРНК в линии гепатоцитов мыши AML12 *in vitro*. Для siРНК-кандидатов, показавших наибольшую активность *in vitro*, была подтверждена эффективность подавления экспрессии гена ганкирина *in vivo* в печени мышей линии BALB/C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

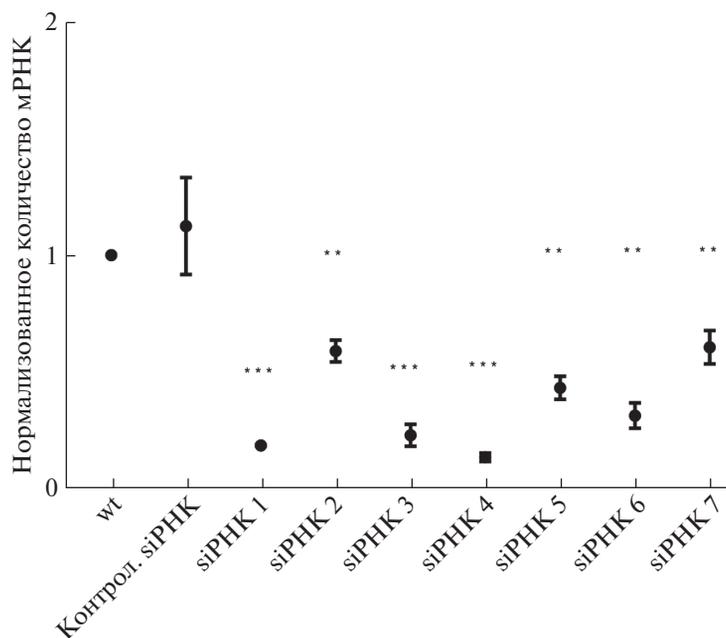
**Оценка эффективности ингибирования мРНК ганкирина в клетках печени мышей.** Для дизайна siРНК, подавляющих экспрессию мРНК ганкирина, нами был проведен анализ последовательности мРНК ганкирина мыши (NM\_001164177.1, NM\_016883.4 NCBI) с исключением возможных участков связывания эндогенных микроРНК, а

также последовательностей, встречающихся в других РНК транскриптома мыши. В результате анализа были выбраны семь siРНК, специфичных к мРНК ганкирина. Для увеличения их стабильности к действию внутриклеточных нуклеаз в процессе синтеза нами были использованы 2'-O-метильные пиримидиновые нуклеотиды и введены тиофосфатные группы между двумя последними нуклеотидами с 3'-конца. Все пиримидиновые нуклеотиды в составе смысловой цепи могут быть заменены, в то время как в антисмысловой цепи необходимо заменять пиримидиновые нуклеотиды только в составе динуклеотидов уридин(цитидин)-аденозин, т.к. при значительной или полной замене возможно снижение эффективности действия siРНК [17].

На следующем этапе мы сравнили эффективность подавления мРНК ганкирина под действием siРНК. Уровень экспрессии мРНК определяли через 24 ч после трансфекции siРНК в гепатоциты мыши AML12 методом ОТ-ПЦР. Степень ингибирования мРНК ганкирина составила  $(80 \pm 7)\%$  для siРНК 1, 3 и 4, для siРНК 5 и 6 – около  $(65 \pm 5)\%$ , а для siРНК 2 и 7 – не более 40% относительно уровня мРНК в контрольных клетках (рис. 1). Для объяснения наблюдаемой разницы в эффективности ингибирования мы проанализировали расположение siРНК на процессированной форме мРНК ганкирина (NM\_016883.4) (рис. 2а), а также вторичную структуру мРНК ганкирина в участках связывания siРНК (рис. 2б, 2в).

Следует отметить, что siРНК 2 и 7 комплементарны 3'-концу последнего экзона мРНК ганкирина, а также попадают в область с наибольшей структурной лабильностью. Видимо, именно возможность образования набора различных структур данной области мРНК ганкирина и определило низкую эффективность siРНК 2 и 7 (рис. 2в). siРНК, продемонстрировавшие среднюю эффективность, попали или на одноцепочечный участок в виде шпильки в структуре мРНК (siРНК 6) или на участок двойной спирали (siРНК 5) (рис. 2б). Возможно, полученные результаты обусловлены недоступностью таких участков из-за связывания с регуляторными белками. Наиболее эффективные siРНК (1, 3 и 4) комплементарны областям мРНК ганкирина, содержащим в своем составе как шпильчатый одноцепочечный участок, так и часть двойной спирали (рис. 2б). Полученные результаты важны для дизайна активных siРНК, однако необходимо учитывать, что релевантность результатов моделирования вторичной структуры РНК с реальной структурой в клетке ограничена [18].

**Оценка эффективности ингибирования мРНК ганкирина в печени мыши.** Мы отобрали две наиболее активные siРНК (3 и 4) для проверки их эффективности *in vivo*. Для этого siРНК были загружены в липидные наночастицы на основе липидоида



**Рис. 1.** Эффективность ингибирования мРНК ганкирина в гепатоцитах мыши AML12 под действием siРНК 1–7. Контроль, siРНК – siРНК к мРНК люциферазы светлячка; wt – контрольные клетки без обработки. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

S12-200 для адресной доставки в гепатоциты [19]. Мы определили эффективность ингибирования мРНК ганкирина *in vivo* после однократной инъекции частиц (дозы siРНК 0.05, 0.2, 0.5, 1 и 2 мг/кг). siРНК 3 и 4 показали высокую эффективность (подавление более 90%) *in vivo* уже при дозе 0.2 мг/кг (рис. 3). Важно отметить, что благодаря химической модификации siРНК даже при высоких дозах (1–2 мг/кг) не проявляли токсических эффектов и не активировали иммунную систему [10].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Дизайн и синтез siРНК.** Дизайн siРНК к мРНК ганкирина (NM\_001164177.1, NM\_016883.4 NCBI) и контрольной siРНК к мРНК люциферазы свет-

лячка (XM\_031473197.1) был проведен по методике, представленной в работе Leboeuf et al. [10]. siРНК (табл. 1) были синтезированы по амидофосфитной схеме (MerMade 12, BioAutomation, США), очищены методом ионообменной хроматографии, а их чистоту подтверждали методом ВЭЖХ-МС.

**Клеточные линии.** Гепатоциты мыши AML12 (ATCC, США) культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 5 мМ глутамин и 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

**Трансфекция клеток AML12 siРНК.** Клетки AML12 (~1 × 10<sup>5</sup> клеток) трансфицировали siРНК в концентрации 10 нМ с помощью реагента Lipofectamine-RNAiMAX (Invitrogen, США) по прото-

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности siРНК

| siРНК             | Смысловая цепь         | Антисмысловая цепь      |
|-------------------|------------------------|-------------------------|
| siРНК 1           | AcAuGuGAAuGcuGucAAuTsT | AUUGAcAGcAUUcAcAUGU TsT |
| siРНК 2           | GGAGGAAGuuGuAuAuuuuTsT | AAAAuAuAcAACU UCCUCCTsT |
| siРНК 3           | GcAuGAGAuGcuGuuAuG TsT | cAuAAcAGcAAUCUcAUGCTsT  |
| siРНК 4           | AcAcuAGccuGuGAuGAATsT  | UUCaUcAcAGGCuAAGUGU TsT |
| siРНК 5           | cucAAGGAGcAAGuAuuuATsT | uAAAuACUUGCUCUUGAG TsT  |
| siРНК 6           | ccGGGAuGAGAuGuAAAATsT  | UUUuAcAAUCUcAUCCCGG TsT |
| siРНК 7           | cAAcuAcAAGGuuAAuuuATsT | uAAAuAACCUUGuAGUUG TsT  |
| Контрольная siРНК | cuUaCgCuGaGuAcUuCgATsT | UCgAaGuAcUcAgCgUaAgTsT  |

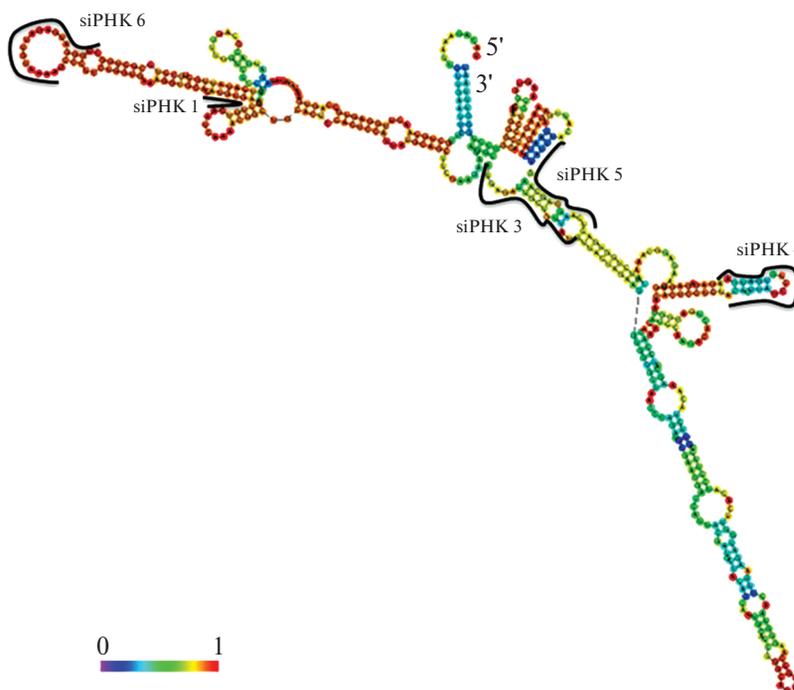
Примечание: заглавные буквы прямого начертания – рибонуклеотиды; заглавные курсивные буквы – дезоксирибонуклеотиды; строчные буквы – 2'-O-метилрибонуклеотиды; s – тиофосфат. Контрольная siРНК – siРНК к гену люциферазы светлячка.

(a)

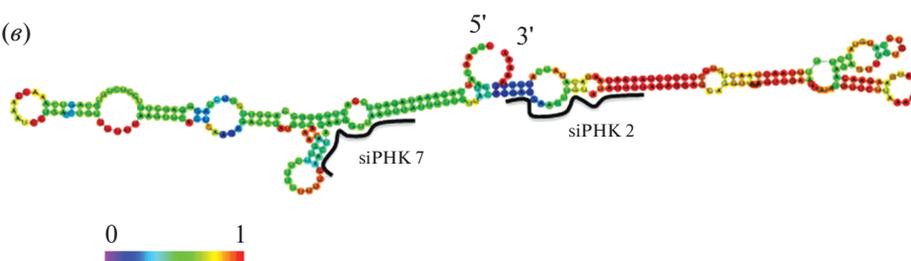
мРНК ганкирина



(б)



(в)

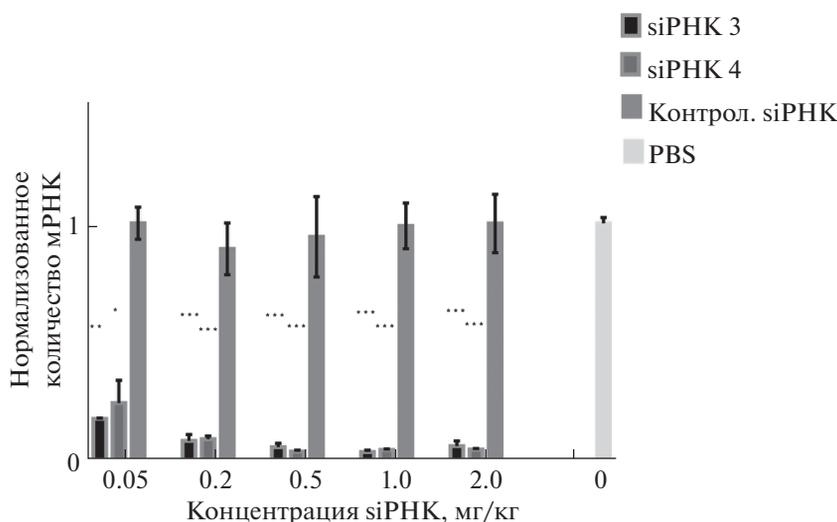


**Рис. 2.** (a) – Схема расположения синтезированных siРНК относительно экзонов мРНК ганкирина мыши; (б, в) – модель участков мРНК ганкирина мыши (NM\_016883.4) с отмеченными местами связывания siРНК и обозначением вероятности образования/стабильности элементов вторичной структуры (цветная шкала): (б) – участок 200–700 нт, (в) – участок 1000–1300 нт мРНК ганкирина мыши.

колу производителя. В качестве контрольной siРНК использовали siРНК к гену люциферазы светлячка (табл. 1). Суммарную РНК выделяли через 24 ч после трансфекции, эффективность ингибирования анализировали методом ОТ-ПЦР.

**Анализ транскрипции генов.** Суммарную РНК из органов мыши или клеток AML12 выделяли с помощью реагента Trizol® (Invitrogen, США) по методике производителя. Далее ~1 мкг суммар-

ной РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific, США) по методике производителя для удаления остатков геномной ДНК и проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора реагентов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Реакционную смесь разбавляли в 3 раза водой и проводили реакцию амплификации в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) с использованием набора реа-



**Рис. 3.** Эффективность ингибирования мРНК ганкирина в гепатоцитах мышей линии BALB/C при инъекции липидных частиц с siRNA 3 и 4. Контроль. siRNA – siRNA к мРНК люциферазы светлячка; PBS – инъекция буфера PBS внутривенно (200 мкл). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

гентов PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, США) по методике производителя (0.3 мкМ смеси праймеров, 0.2 мкг кДНК). Для амплификации мРНК ганкирина использовали праймеры, последовательности которых представлены в табл. 2 (дизайн праймеров проведен в рамках данной работы); количество целевой РНК нормировали по мРНК Gapdh. Продукты реакции анализировали методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле в TAE-буфере (40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, pH 7.6).

**Предсказание вторичной структуры мРНК ганкирина.** Для определения возможной вторичной структуры мРНК ганкирина (NM\_001164177.1, NM\_016883.4 NCBI) использовали программу ViennaRNA (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>), которая позволяет предсказывать вторичные структуры РНК, обладающие минимальной свободной энергией, и учитывать вероятности образования пар оснований для РНК.

**Таблица 2.** Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР

| Праймер | Нуклеотидная последовательность (5' → 3') |
|---------|---|
| Gank-F  | TTGAAGGAGCGCATTTTGGC                      |
| Gank-R  | AGCGGAGGCAGCAATATGAA                      |
| Gapdh-F | TGCACCACCAACTGCTTAGC                      |
| Gapdh-R | GGCATGGACTGTGGTCATGAG                     |

#### Получение липидных частиц, содержащих siRNA.

Формулирование siRNA (табл. 1) в липидные наночастицы проводили путем смешивания водного раствора (10 мМ цитратный буфер, pH 3.0) 0.4 мг/мл siRNA со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже на приборе The NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems, США). Липидная смесь содержала следующие компоненты: ионизируемый липидоид C12-200, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids, США), холестерин (Sigma-Aldrich, США), C14-PEG-2000 (Avanti Polar Lipids, США) в молярном соотношении (%) 50 : 10 : 38.5 : 1.5. Количество липидов на единицу siRNA рассчитывали из массового соотношения siRNA к ионизируемому липидоиду C12-200 – 1 : 5. Для формирования частиц требуемого размера водную и спиртовую фазы смешивали в соотношении 3 : 1 по объему с общей скоростью смешивания 10 мл/мин. После смешения фаз полученную водно-спиртовую суспензию частиц диализовали в 500 объемах фосфатно-солевого буфера (pH 7.4, 12 ч, комнатная температура). После диализа частицы фильтровали в стерильных условиях через фильтр с мембраной из PES 0.22 мкм (Merck, США) и хранили при 4°C.

После фильтрации качество полученных частиц анализировали по двум параметрам: загрузка siRNA и размер частиц ( $80-90 \pm 5$ ) нм (Zetasizer Nano ZSP, Malvern Panalitical, США). Концентрацию загруженной в липидные наночастицы siRNA определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific, США) суспензии частиц до их разрушения и после.

Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США).

**Определение эффективности siРНК *in vivo*.** Для оценки эффективности синтезированных siРНК *in vivo* мышам линии BALB/C (самки,  $n = 48$ , возраст 7–8 недель, 17–20 г, питомник “Столбовая”, Москва, Россия) внутривенно вводили липидные частицы, содержащие siРНК 3 и 4, либо частицы с контрольной siРНК, синтезированные по описанной выше методике.

До проведения эксперимента мышам взвешивали, рассчитывали необходимый для введения объем раствора siРНК, загруженной в липидные наночастицы. Препараты вводили в хвостовую вену в дозах siРНК 0.05, 0.2, 0.5, 1 и 2 мг/кг (три мыши в группе). В качестве дополнительной контрольной группы использовали животных, которым вводили 200 мкл раствора PBS внутривенно (три мыши в группе). Через 72 ч после введения животных наркотизировали с помощью 2%-ного изофлурана и извлекали печень. Кусочки печени (~30–50 мг) помещали в жидкий азот, после чего выделяли суммарную РНК реагентом Trizol® (Invitrogen, США) по методике производителя и анализировали уровень снижения мРНК ганкирина методом ОТ-ПЦР.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы нами были проведены дизайн, синтез и валидация siРНК для подавления экспрессии ганкирина *in vitro* и *in vivo*. Согласно результатам моделирования вторичной структуры мРНК ганкирина мышам, наиболее эффективные siРНК комплементарны фрагментам мРНК, формирующим одновременно одно- и двухпочечные участки. Полученные siРНК могут быть использованы для изучения роли ганкирина в развитии ряда онкологических и метаболических заболеваний в моделях на животных.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-29-08046 – дизайн и синтез siРНК) и Российского научного фонда (грант 20-74-00116 – валидация siРНК *in vitro* и *in vivo*).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и одобрены этическим комитетом Института биологии развития человека (Москва, Россия).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sergeeva O., Sviridov E., Zatsepin T. // *Semin. Liver Dis.* 2020. V. 40. P. 70–83. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693513>
2. Burenina O.Y., Lazarevich N.L., Kustova I.F., Shavochkina D.A., Moroz E.A., Kudashkin N.E., Patyutko Y.I., Metelin A.V., Kim E.F., Skvortsov D.A., Zatsepin T.S., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2020. in press. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03378-5>
3. Sun W., Ding J., Wu K., Ning B.-F., Wen W., Sun H.-Y., Han T., Huang L., Dong L.-W., Yang W., Deng X., Li Z., Wu M.-C., Feng G.-S., Xie W.-F., Wang H.-Y. // *Hepatology.* 2011. V. 54. P. 1259–1272. <https://doi.org/10.1002/hep.24530>
4. Liu Y., Higashitsuji H., Higashitsuji H., Itoh K., Sakurai T., Koike K., Hirota K., Fukumoto M., Fujita J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 432. P. 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.093>
5. Chattopadhyay A., O'Connor C.J., Zhang F., Galvagnion C., Galloway W.R.J.D., Tan Y.S., Stokes J.E., Rahman T., Verma C., Spring D.R., Itzhaki L.S. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 23732. <https://doi.org/10.1038/srep23732>
6. Thakur P., Hassan I. // *Int. J. Comput. Biol. Drug. Des.* 2011. V. 4. P. 373–386. <https://doi.org/10.1504/IJCBDD.2011.044404>
7. Zamani P., Riahi M.M., Momtazi-Borojeni A.A., Jami-alahmadi K. // *Artif. Cells.* 2018. V. 46. P. 1301–1313. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1388250>
8. Schuster S., Miesen P., Rij R. // *Viruses.* 2019. V. 11. P. 448. <https://doi.org/10.3390/v11050448>
9. Shi S., Wang L., Han D., Wu J., Jiao D., Zhang K., Chen J., Li Y., Yang F., Zhang J., Zheng G., Yang A., Zhao A., Qin W., Wen W. // *Theranostics.* 2019. V. 9. P. 1247–1263. <https://doi.org/10.7150/thno.29884>
10. Leboeuf D., Abakumova T., Prikazchikova T., Rhym L., Anderson D., Zatssepin T., Piatkov K. // *Mol. Ther.* 2020. V. 28. P. 1092–1104. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.021>
11. Sharp P. // *Genes & Develop.* 1999. V. 13. P. 139–141.
12. Schwarz D., Ding H., Kennington L., Moore J., Schelter J., Burchard J., Linsley P., Aronin N., Xu Z., Zamore P. // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. P. e140. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020140>
13. Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloon B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., Labow M., Reinhardt M., Natt F., Hall J. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 995–1001. <https://doi.org/10.1038/nbt1118>
14. He F., Han Y., Gong J., Song K., Wang H., Li Y. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 44836. <https://doi.org/10.1038/srep44836>
15. Ichihara M., Murakumo Y., Masuda A., Matsuura T., Asai N., Jijiwa M., Ishida M., Shinmi J., Yatsuya H.,

- Qiao S., Takahashi M., Ohno K.* // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. e123.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm699>
16. *Shabalina S., Spiridonov A., Ogurtsov A.* // *BMC Bioinformatics.* 2006. V. 7. P. 65.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-65>
17. *Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.* // *Cell.* 2003. V. 115. P. 29–216.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00801-8)
18. *Velema W., Kool E.* // *Nat. Rev. Chem.* 2020. V. 4. P. 22–37.  
<https://doi.org/10.1038/s41570-019-0147-6>
19. *Love K., Mahon K., Levins C., Whitehead K., Querbes W., Dorkin J., Qin J., Cantley W., Qin L., Racie T., Frank-Kamenetsky M., Yip K., Alvarez R., Sah D., de Fougères A., Fitzgerald K., Kotliansky V., Akinc A., Langer R., Anderson D.* // *PNAS.* 2010. V. 107. P. 1864–1869.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0910603106>

## Design and Validation of siRNA Targeting Gankyrin in the Murine Liver

T. A. Prikazchikova\*, T. O. Abakumova\*, O. V. Sergeeva\*.,# , and T. S. Zatsepin\*, \*\*

# Phone: +7 (926) 388-08-65; e-mail: o.sergeeva@skoltech.ru

\*Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoy bulv. 30, str. 1, Moscow, 121205 Russia

\*\*Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, str. 3, Moscow, 119991 Russia

Despite recent success in the treatment of hepatocellular carcinoma and other liver cancers, development of new therapeutic approaches remains an unmet medical need. Application of nucleic acids therapeutics allows prolong suppressing of undruggable targets. Nucleic acids therapeutics can be used either independently or in combination with small molecules and antibodies. Here we performed design, synthesis and validation of siRNAs targeting gankyrin mRNA *in vitro* and *in vivo*. As gankyrin upregulation in hepatocellular carcinoma causes increased hepatocytes proliferation, gankyrin is a promising therapeutic target. We have shown that the most effective miRNAs are complementary to mRNA fragments that form both single- and double-stranded regions as predicted by modeling of gankyrin mRNA secondary structure. The most efficient siRNAs were formulated in lipid nanoparticles and showed downregulation of gankyrin mRNA in the murine liver for more than 90% after a single injection 0.2 mg/kg. Selected siRNAs can be used to study the role of gankyrin in the development of liver cancer and metabolic diseases in murine models.

*Keywords: small interfering RNAs, liver, gankyrin, RNA interference*



## ДНК С 2-ПИРИДИЛДИТИОГРУППОЙ ПРИ С2'-АТОМЕ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ФИКСАЦИИ БЕЛКА MutS С СОХРАНЕНИЕМ ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2021 г. С. А. Перри\*, Е. А. Кубарева\*, М. В. Монахова\*<sup>#,</sup>, Р. М. Трикин\*\*, Е. М. Косарецкий\*, Е. А. Романова\*, В. Г. Метелев\*, П. Фридрихс\*<sup>\*\*\*</sup>, Т. С. Орецкая\*

\* Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, химический факультет и факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

\*\* ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

\*\*\* Институт биохимии, FB 08, Университет Ю. Либиха, D-35392 Гуссен, Германия, Heinrich-Buff-Ring, 17

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 18.10.2020 г.

Принята к публикации 20.10.2020 г.

Нековалентные ДНК-белковые взаимодействия лежат в основе жизнедеятельности клеток. Ковалентные связи между ДНК и белком, возникающие при воздействии различных эндогенных и экзогенных факторов, а также химиотерапевтических агентов, как правило, нарушают нормальное функционирование ДНК-связывающих белков. Олигодезоксирибонуклеотиды с реакционноспособной группировкой используются как инструменты для подтверждения элементов структуры и механизмов действия таких белков. Для фиксации белка MutS, являющегося сенсором системы MMR (система репарации “мисматчей”, mismatch repair system) из *Escherichia coli*, через остаток цистеина предложено использовать ДНК с 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группой в составе нуклеозида в заданном положении олигомерной цепи и с двумя флуорофорами. Дуплекс представляет собой набор комплементарных олигонуклеотидов с разрывами в “верхней” и “нижней” цепях. Это позволяет варьировать место введения реакционноспособной группировки, синтезируя только центральный фрагмент ДНК минимальной длины. Конъюгат MutS с ДНК был получен реакцией тиол-дисульфидного обмена с количественным выходом и очищен от непрореагировавшей ДНК с использованием эксклюзионной хроматографии. Методом флуоресцентного резонансного переноса энергии показано, что белок MutS в составе конъюгата сохраняет способность изменять свою конформацию и конформацию ДНК, что свидетельствует о сохранении его активности.

**Ключевые слова:** реакционноспособные ДНК, ковалентная фиксация белков на ДНК, тиол-дисульфидный обмен, репарация неканонических пар нуклеотидов, MutS

DOI: 10.31857/S0132342321020202

### ВВЕДЕНИЕ

Метод ковалентного связывания (“кросслин-кинг”) белков с ДНК позволяет зафиксировать комплекс, образующийся в результате взаимодействия биомолекул, а также изучить особенности его формирования, локализацию белков на ДНК

Сокращения: FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии; МАНТ-АДР – 2'/3'-O-(N-метилантранилоил)аденозин-5'-дифосфат; MMR – система репарации “мисматчей” в ДНК (mismatch repair system); PDB – база данных Protein Data Bank;  $\underline{\text{U}}$  – остаток 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]уридина. Префикс “d” (дезокси) при обозначении олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: +7 (495) 939-31-48; эл. почта: monakhovamv@gmail.com).

и расположение всех компонентов комплекса относительно друг друга и ДНК. Данный подход предусматривает следующие этапы исследования: 1) конструирование модельной системы, состоящей из белка и нуклеиновой кислоты, содержащих реакционноспособные группировки, и позволяющей с высоким выходом получить конъюгат белка с ДНК-лигандом; 2) выделение конъюгата в гомогенном состоянии; 3) проверка функциональной активности белка в составе конъюгата.

Для ковалентного связывания компонентов белково-нуклеинового комплекса предложено множество реакционноспособных группировок, различающихся по природе образующейся химической связи, скорости и эффективности ее формирования [1–8].

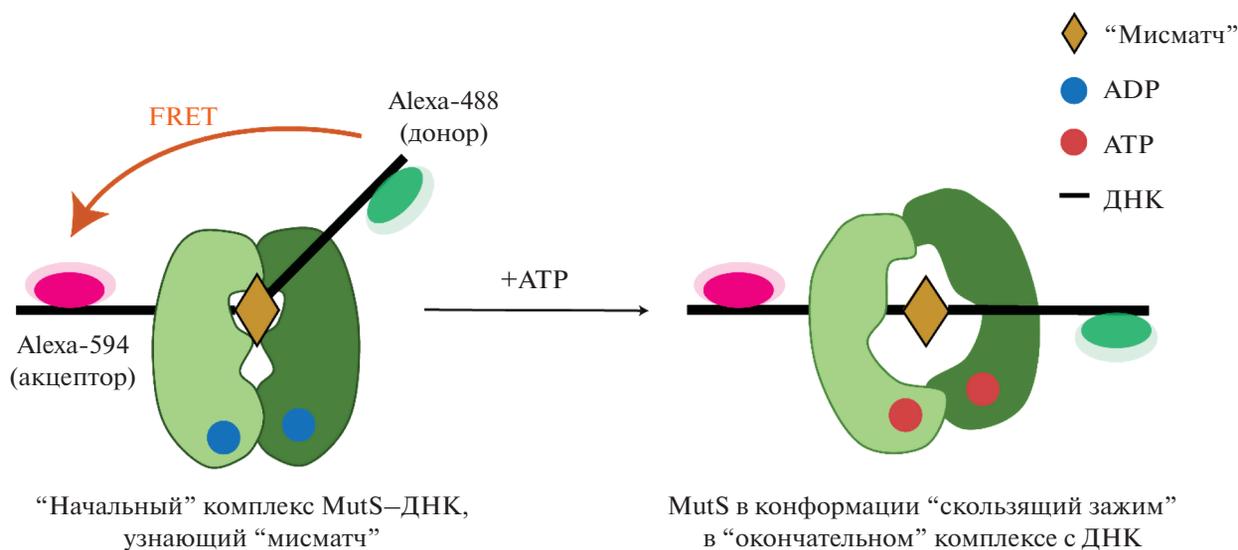


Рис. 1. Конформационные переходы ДНК в комплексе с белком MutS (по данным Putnam [22]).

Мы сосредоточили свои усилия на разработке методов “кроссликинга” белков с ДНК, основанных на реакции тиол-дисульфидного обмена [9–16]. В данной работе продолжено изучение свойств ДНК, содержащих 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группу в составе нуклеозида в заданном положении цепи. Эта группировка позволяет зондировать электростатические контакты белка с углеводофосфатным остовом ДНК. Она успешно использовалась при изучении свойств фактора транскрипции NF-κB [14] и нуклеазы *BspD6I* [15]. В данной работе мы поставили задачу выделить ковалентно связанный комплекс белка с ДНК, содержащей 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группу, и выяснить, сохраняет ли он свою функциональную активность в составе конъюгата.

В качестве модели для изучения свойств разрабатываемых нами ДНК-реагентов хорошо зарекомендовал себя белок MutS из системы репарации неканонических пар нуклеотидов или “мисматчей” (MMR) *Escherichia coli*. MutS представляет собой сенсор, сканирующий ДНК в поисках “мисматча”. В присутствии ADP MutS узнает и связывает “мисматч”-содержащую ДНК, образуя с ней стабильный “начальный” комплекс. Связывание MutS приводит к изгибу линейной ДНК на 60° в случае пары G/T. Известно, что большинство контактов белка MutS с ДНК являются электростатическими, и аминокислотные остатки в районе “мисматча” сближены именно с углеводофосфатным остовом [17–21].

В присутствии ATP происходит формирование “окончателного” комплекса, в котором MutS переходит в конформацию “скользящий зажим”, что сопровождается уходом белка от некомплементарной пары и распрямлением ДНК [22–24]. Описанные конформационные переходы ДНК в

комплексе с MutS можно наблюдать по изменению сигнала флуоресцентного резонансного переноса энергии [9, 25, 26] (рис. 1).

Ранее нами уже были получены и выделены конъюгаты MutS с ДНК и показана возможность проверки функциональной активности зафиксированного белка [9, 16]. В первом случае конъюгаты представляли собой мутантные формы MutS, “сшитые” с 3'-концевой [3-(3-гидроксипропил)дитио]пропил]фосфатной группой, что являлось определенным ограничением для последующих исследований взаимодействия MutS с другими белковыми партнерами. Во втором случае модификация в ДНК вводилась по C5-атому тимидина, содержащему гексаметиленовый линкер. В зависимости от модифицирующего агента в работе были синтезированы ДНК, содержащие пиридилдитиогруппу на различном расстоянии от ДНК (18–50 Å). Однако такие ДНК-реагенты не позволяют реализовать “сшивку нулевой длины”, т.е. фиксировать контакты белка на более близком (~10 Å) расстоянии от ДНК.

Использование пиридилдитиогруппы, включенной в 2'-положение нуклеотида, дает возможность синтезировать ДНК-реагент без разрыва в месте модификации и получить конъюгат MutS–ДНК на коротком линкере (~7 Å). 17-Звенный олигодезоксирибонуклеотид, несущий 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]группу, являлся фрагментом дуплекса (I), составленного из четырех комплементарных олигонуклеотидов, два из которых содержат флуорофоры (рис. 2). Такой ДНК-дуплекс может работать как “конструктор”, аналогично предложенному нами ранее в работе Perevozchikova et al. [25]. Дизайн дуплекса позволяет менять только один олигонуклеотид с реакционноспособной группой, если нуж-

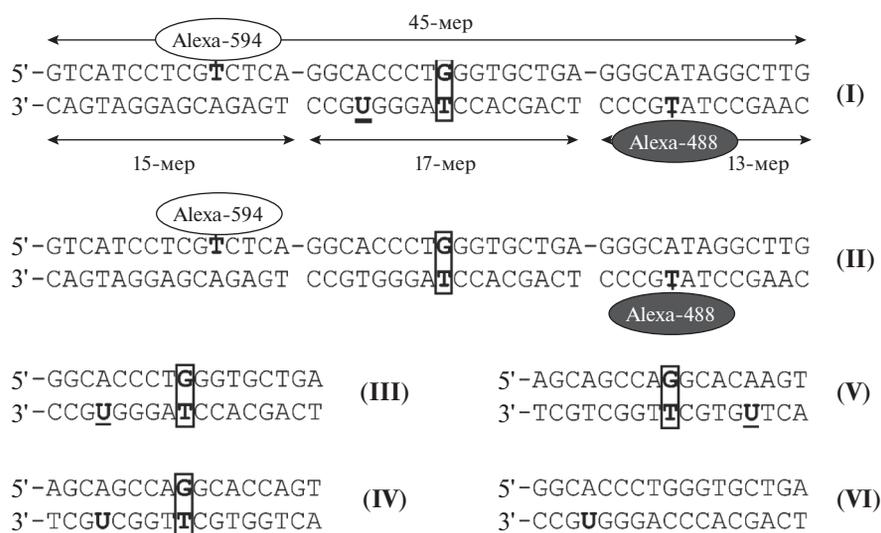


Рис. 2. Модифицированные ДНК-дуплексы, использованные в данной работе.  $\underline{U}$  – 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридил-дитио)пропионамидо]урдин.

но варьировать положение модификации относительно “мисматча” и флуоресцентных меток.

В представленной работе подобраны оптимальные условия ковалентного связывания мутантных форм MutS из *E. coli* – MutS(A469C/Δ801–853) и MutS(N497C/Δ801–853) – с ДНК. Оптимизирован метод эксклюзионной хроматографии, позволивший выделить конъюгат MutS–ДНК. Основываясь на изменении интенсивности сигнала FRET, мы показали, что зафиксированный на ДНК белок MutS является функционально активным: находясь в составе конъюгата, он способен изменять конформацию ДНК в присутствии АТР.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Конструирование модельных реакционноспособных фрагментов ДНК.** В качестве базового ДНК-лиганда был использован 45-звенный дуплекс (II) (рис. 2), представляющий собой фрагмент последовательности плазмиды pUC-MMR, который хорошо себя зарекомендовал в экспериментах по исследованию инициации репарации “мисматчей” ДНК с помощью белков MutS, MutL и MutH *in vitro* [27]. Этот дуплекс в центральной позиции содержит G/T-пару, которая является одним из повреждений, наиболее эффективно узнаваемых и репарируемых системой MMR [28].

Предложенный ДНК-дуплекс имеет важную особенность: он содержит в своем составе FRET-пару, состоящую из флуорофоров Alexa-488 (донор, максимумы  $\lambda_{\text{погл}}/\lambda_{\text{исп}} = 495/519$  нм) и Alexa-594 (акцептор, максимумы  $\lambda_{\text{погл}}/\lambda_{\text{исп}} = 590/617$  нм). Эти флуорофоры присоединены к С5-атому остатка тимидина через гексаметиленовые линкеры и находятся в разных цепях ДНК-дуплекса на

расстоянии 12 п.н. от “мисматча”. В работе Cristóvão et al. [17] было показано, что такие модифицированные гетероциклические основания в составе ДНК не являются субстратами системы репарации MMR и могут быть использованы в качестве флуоресцентных меток. Ранее нами было продемонстрировано, что FRET-пара в составе дуплекса (II) позволяет следить за изменением его пространственной структуры [25].

Для получения 45-звенного ДНК-дуплекса (II) мы использовали гибридизацию на олигонуклеотиде-матрице (“верхняя” цепь), содержащем остаток G в “мисматче” и флуорофор Alexa-594, трех олигонуклеотидов (“нижняя” цепь): 13-мера с Alexa-488, 17-мера с остатком T в “мисматче” и 15-мера. Предложенная конструкция дуплекса позволяет варьировать структуру как 15-, так и 17-мера, вводя в заданную позицию модифицированное звено с пиридилдисульфидной группой, не меняя олигонуклеотид-матрицу и сохраняя оптимальное расположение FRET-пары (например, дуплекс (I), рис. 2). Наличие разрывов в цепи ДНК не влияет на характер связывания MutS с ДНК-лигандом, содержащим некомплементарную пару [17, 25].

Следующим этапом работы был выбор места введения пиридилдисульфидной группировки в 17-звенный фрагмент “нижней” цепи 45-звенного дуплекса. Ранее для “кросслинкинга” белка с дисульфид-содержащей ДНК нами были успешно использованы мутантные формы MutS, содержащие остаток Суs в положениях A469 или N497, локализованных в составе домена “зажим”. Эти аминокислотные остатки эффективно взаимодействовали с ДНК, несущими дисульфидную группировку, присоединенную к 3'-концу седь-

**Таблица 1.** Кристаллические структуры MutS с ДНК\*

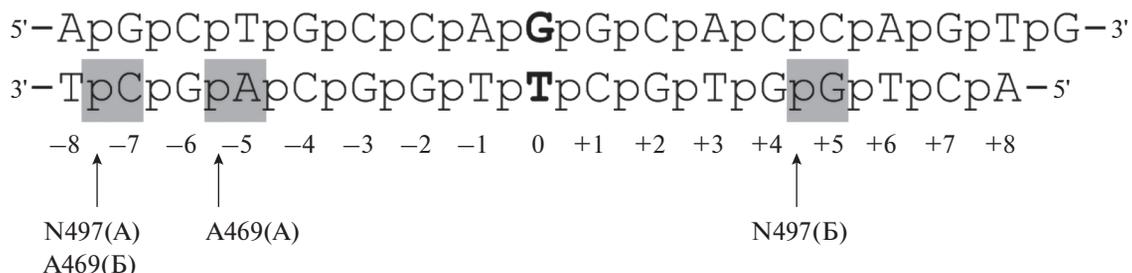
| ДНК-лиганд<br>(5'–3')<br>(3'–5')                                     | Кофакторы             | Разрешение, Å | Код PDB | Ссылка |
|--|-----------------------|---------------|---------|--------|
| AGCTGCCAGGCACCAGTGTTCAGCGTCCTAT<br>TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTCGCAGGATA   | АТР, Mg <sup>2+</sup> | 2.27          | 1W7A    | [29]   |
| AGCTGCCAAGCACCAGTGTTCAGCGTCCTAT<br>TCGACGGTACGTGGTTCACAGTCGCAGGATA   | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.40          | 1OH6    | [20]   |
| AGCTGCCAGGCACCAGTG<br>TCGACGGTTCGTGGTCA                              | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.10          | 1WB9    | [30]   |
| AGCTGCCAGGCACCAGTG<br>TCGACGGTTCGTGGTCA                              | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.50          | 1WBB    | [30]   |
| AGCTGCCAGGCACCAGTGTTCAGCGTCCTAT<br>TCGACGGTTCGTGGTTCACAGTCGCAGGATA   | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.20          | 1E3M    | [31]   |
| AGCTGCCACGCACCAGTGTTCAGCGTCCTAT<br>TCGACGGTACGTGGTTCACAGTCGCAGGATA   | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.90          | 1OH5    | [20]   |
| AGCTGCCAGGCACCAGTGTTCAGCGTCCTAT<br>TCGACGGTGCGTGGTTCACAGTCGCAGGATA   | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.50          | 1OH7    | [20]   |
| AGCTGCCA-GGCACCAGTGTTCAGCGTCCTAT<br>TCGACGGTTCGGTGGTTCACAGTCGCAGGATA | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.90          | 1OH8    | [20]   |
| AGCTGCCAGGCACCAGTG<br>TCGACGGTTCGTGGTCA                              | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 2.40          | 1WBD    | [20]   |
| AGCTGCCAGGCACCAGTGTCA<br>TCGACGGTTCGTGGTTCACAGT                      | АДР, Mg <sup>2+</sup> | 3.10          | 3ZLJ    | [32]   |

\* Все структуры получены для MutS из *Escherichia coli* (штамм K12) P23909. Кристаллизовали один и тот же полноразмерный белок длиной 800 а.о. Полужирным шрифтом выделены неканонические пары в ДНК-дуплексах.

мого нуклеотида в 3'-направлении от остатка Т “мисматча” (положение –7) [16].

В базе данных Protein Data Bank (PDB) найдены 10 структур комплексов MutS с ДНК [20, 29–32] (табл. 1). Анализ трех кристаллических структур MutS в комплексе с дуплексом, содержащим “мисматч” (PDB: 1W7A, 1OH7, 1E3M), а также данных литературы [20, 30] показал, что А469 или N497 сближены с нуклеотидами не только в положении –7, но и в пятом положении в 5'- или 3'-направлении от Т “мисматча” (положения +5 и –5), независимо от молекулы кофактора, а также дли-

ны дуплекса (табл. 2, рис. 3). Мы рассчитали расстояния (Å) от первого атома углерода (СВ) боковой цепи А469 и N497 до атома С2' нуклеотидов в 5'- или 3'-направлении от Т “мисматча” (табл. 2). При замене А469 и N497 на Сус и введении в нуклеотид модифицированной группировки расстояние между реагирующими группами может сократиться до 3–4 Å. Такое расстояние должно обеспечить возможность протекания химической реакции между MutS и 2-пиридилдисульфидной группой в 2'-положении углеводного фрагмента ДНК.



**Рис. 3.** Контакты углеводного фрагмента и фосфатного остатка нуклеотидов в положениях –7, –5 и +5 ДНК-дуплекса с субъединицами А и Б гомодимера MutS в белково-нуклеиновом комплексе (PDB: 1WB9).

**Таблица 2.** Рассчитанные расстояния от атома СВ боковой цепи А469 и N497 до атома С2' нуклеотида в структурах комплексов MutS–ДНК\*

| Положение нуклеотида** | Расстояние, Å |               |               |               |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                        | A469          |               | N497          |               |
|                        | субъединица А | субъединица Б | субъединица А | субъединица Б |
| –7                     | 19.29         | 8.51          | 9.05          | 22.22         |
|                        | 19.18         | 9.92          | 8.29          | 22.55         |
|                        | 19.30         | 9.71          | 8.14          | 22.61         |
| –5                     | 9.54          | 15.44         | 13.19         | 17.96         |
|                        | 9.62          | 15.25         | 13.39         | 17.89         |
|                        | 9.61          | 15.23         | 13.40         | 17.98         |
| +5                     | 22.43         | 28.05         | 30.27         | 8.56          |
|                        | 22.54         | 27.90         | 30.55         | 8.54          |
|                        | 22.37         | 27.83         | 30.51         | 8.48          |

\* Рассматривались структуры комплексов с кодами PDB: 1WB9 (первая строка для каждого из рассматриваемых нуклеотидов), 1E3M – вторая строка, 1W7A – третья строка.

\*\* Указано положение нуклеотида относительно Т “мисматча” (со знаком минус – в 3'-направлении, со знаком плюс – в 5'-направлении).

Для проверки этого предположения была сконструирована серия 17-звенных ДНК-дуплексов (рис. 2). ДНК-дуплекс (III) входит в состав предложенной нами 45-звенной системы. Последовательность в дуплексах (IV) и (V) соответствует последовательности фрагмента дуплекса, использовавшегося при кристаллизации комплекса MutS с ДНК [31]. В этих дуплексах единственный остаток U введен в 5-ю позицию с одной или другой стороны от Т “мисматча”. Поскольку контакты MutS с ДНК (кроме области “мисматча”) носят неспецифический характер, мы посчитали возможным заменить в “нижней” цепи остаток А (5-й с 3'-конца от “мисматча”) на U. В качестве контроля синтезирован модифицированный дуплекс (VI), который является аналогом дуплекса (III), но не содержит “мисматча”. Белок MutS, отвечающий за узнавание “мисматча”, должен взаимодействовать с таким дуплексом менее эффективно по сравнению с остальными. Для получения дуплексов (III–VI) 2'-дисульфидсодержащие 17-звенные олигонуклеотиды, синтезированные по методике Metelev et al. [15], гибридизовали с комплементарными матрицами.

**Характеристика мутантных форм белка MutS с единичным остатком цистеина.** Для создания белков MutS, содержащих единственный остаток Cys (SC, Single Cys), мы использовали вариант белка MutS – CFMutS(Δ801–853), который не имеет остатков Cys (Cys Free), а также не содержит 53 С-концевые аминокислоты, практически не важные для процесса репарации “мисматчей” [33], но участвующие в тетрамеризации MutS [31]. В реакция ковалентного связывания MutS с модифицированными ДНК, требующих высокой концентрации биомолекул, олигомеризация белка нежелательна. Ранее было доказано, что CFMutS(Δ801–853) имеет то же сродство к ДНК с G/Т-парой, что

и белок дикого типа (WTMutS) [34]. Далее для белка CFMutS и мутантных форм, полученных на его основе, обозначение (Δ801–853) опущено. В качестве контроля в данной работе использовали полноразмерный WTMutS, содержащий шесть остатков Cys на мономер белка.

Генетические конструкции для экспрессии мутантных форм SCMutS(A469C) и SCMutS(N497C) были получены ранее сайт-направленным мутагенезом [16]. Белки выделяли, как описано в работах Heinze et al. [16] и Feng et al. [35]. Характеристика их свойств в сравнении с WTMutS и CFMutS приведена ниже. Далее по тексту аббревиатура SC опускается. Согласно имеющимся данным [16, 25, 36], при связывании белка MutS с ДНК даже канонического строения происходит ускорение обмена ADP (вплоть до 10-кратного) в АТРазных доменах гомодимера WTMutS. Сравнительную характеристику мутантных форм по этому признаку выполняли с использованием флуоресцентного аналога ADP – 2'/3'-O-(N-метилантранилоил)аденозин-5'-дифосфата (МАНТ-ADP) – в отсутствие и в присутствии 30-звенного дуплекса (VII) 5'-CAAGCCTATGCCCTCAGCACCCAGG-GTGCC-3'/3'-GTTTCGGATACGGGAGTCGTG-GGTCCCACGG-5', не содержащего “мисматч” (концентрация 500 нМ).

В отсутствие ДНК в реакционной смеси значения констант скорости высвобождения МАНТ-ADP оказались сходными (в пределах погрешности) для всех вариантов MutS (0.007–0.012 с<sup>-1</sup>) (табл. 3). В присутствии ДНК для WTMutS, CFMutS и MutS(A469C) получены близкие значения  $k_{off}$  (0.043–0.049 с<sup>-1</sup>). Таким образом, обмен МАНТ-ADP на ADP в АТРазных доменах этих вариантов MutS в присутствии ДНК в условиях наших экспериментов происходил в 4–6 раз быстрее по

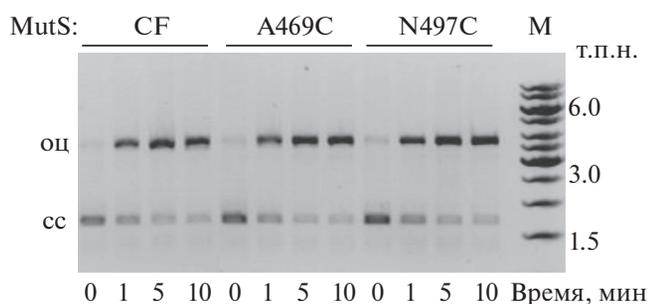
**Таблица 3.** Эффективность обмена МАНТ-ADP на ADP в АТРазных доменах различных форм MutS

| Белок       | Скорость высвобождения МАНТ-ADP из комплекса с белком MutS, $k_{\text{off}}$ , $\text{с}^{-1}$ * |   | Ускорение обмена ADP в MutS в присутствии ДНК, $k_{\text{off}}(+\text{ДНК})/k_{\text{off}}(-\text{ДНК})$ |
|-------------|--|---|--|
|             | в отсутствие дуплекса (VII), $k_{\text{off}}(-\text{ДНК})$                                       | в присутствии дуплекса (VII), $k_{\text{off}}(+\text{ДНК})$ |  |
| WTMutS      | $0.012 \pm 0.001$  | $0.043 \pm 0.002$   | 3.6  |
| CFMutS      | $0.008 \pm 0.002$  | $0.047 \pm 0.001$   | 5.6  |
| MutS(A469C) | $0.011 \pm 0.005$  | $0.049 \pm 0.007$   | 4.3  |
| MutS(N497C) | $0.007 \pm 0.003$  | $0.015 \pm 0.003$   | 2.3  |

\* Приведены средние значения трех экспериментов  $\pm$  s.d.

сравнению с реакционной смесью в отсутствие ДНК. Для MutS(N497C) наблюдалось не столь эффективное ускорение обмена ADP в АТРазных доменах – в 2.3 раза (табл. 3), что может быть связано либо с меньшим сродством рассматриваемой мутантной формы MutS к ДНК, либо с некоторым нарушением взаимной регуляции АТРазных и ДНК-связывающего доменов в этом белке.

Для характеристики функциональных свойств полученных мутантных форм белков была исследована способность MutS(A469C), MutS(N497C) и CFMutS активировать гидролиз суперскрученной (сс) плазмиды pUC-MMR, содержащей неканоническую G/T-пару и последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTm<sup>6</sup>AG-5', эндонуклеазой MutH в присутствии белка MutL (рис. 4). Об активности MutH судили по образованию ДНК с разрывом только в одной из цепей (оц – одноцепочечный разрыв). Реакционные смеси анализировали в агарозном геле, содержавшем бромид этидия. Оценивали увеличение в ходе реакции интенсивности зоны, соответствующей плазмиде с одноцепочечным разрывом.



**Рис. 4.** Анализ продуктов гидролиза белком MutH плазмиды pUC-MMR, содержащей неканоническую пару G/T и монометилированную последовательность 5'-GATC-3'/3'-CTm<sup>6</sup>AG-5', в присутствии MutL и мутантных форм MutS методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с бромидом этидия. Верхние зоны соответствуют ДНК с разрывом только в одной из цепей (оц), а нижние – суперскрученной плазмиде (сс). М – маркер длины ДНК GeneRuler™ 1 kb.

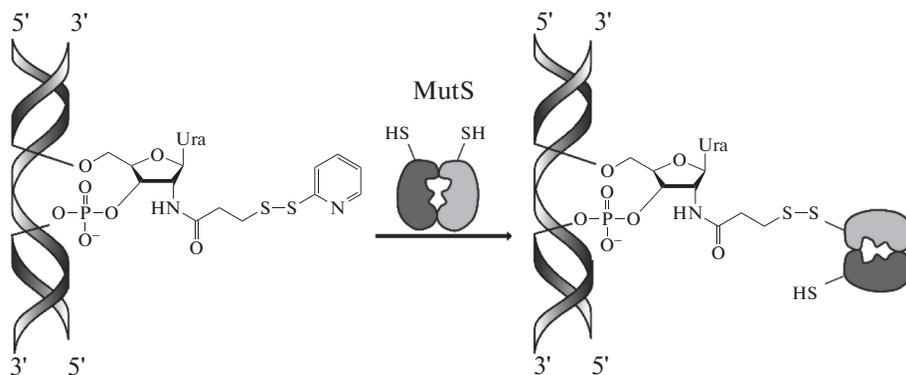
В наших экспериментах уже за 5 мин наблюдался практически полный переход ДНК-субстрата с G/T-“мисматчем” в ДНК с одноцепочечным разрывом в присутствии CFMutS (рис. 4). Эффективность гидролиза ДНК эндонуклеазой MutH в присутствии MutS(A469C) и MutS(N497C) в пределах ошибки близка к таковой для CFMutS. Интересно, что мутантная форма MutS(N497C), характеризующаяся пониженной способностью к обмену ADP в присутствии ДНК, активировала последующие этапы репарации.

Таким образом, мутантные формы MutS, содержащие единственный остаток Cys на мономер в положениях 469 и 497, сохраняют основные биохимические свойства белка MutS и в дальнейшем могут использоваться для структурно-функциональных исследований системы MMR.

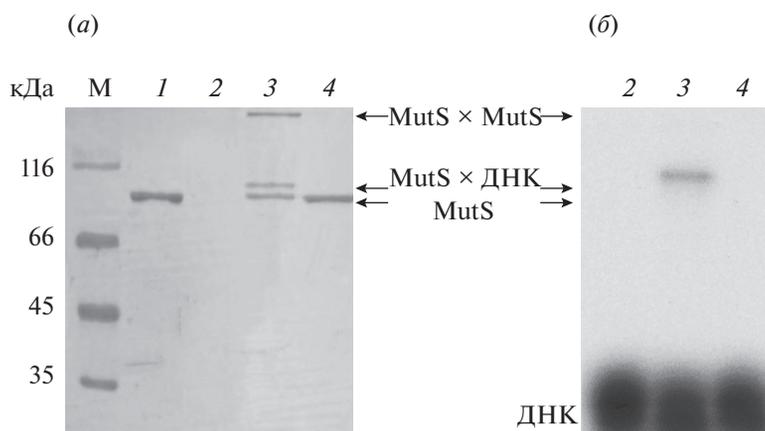
**Взаимодействие мутантных форм MutS с 17-звенными ДНК-дуплексами с 2'-пиридилдисульфидной группировкой.** Схема реакции между гомодимером мутантной формы MutS, содержащим единственный остаток Cys на мономер, и ДНК с одним остатком 2'-дезоксидеокси-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]уридина представлена на рис. 5.

45-Звенный дуплекс (I), предложенный нами для последующих экспериментов, содержит в своем составе 17-звенный дуплекс (III) с реакционноспособной группировкой. Поэтому взаимодействие именно дуплекса (III) с мутантными формами MutS было охарактеризовано нами в первую очередь. В экспериментах использовали белок MutS(A469C), т.к. он проявлял наибольшее сходство с белком дикого типа. Более того, остаток 469 субъединицы А гомодимера MutS находится также на расстоянии  $<10 \text{ \AA}$  от положения –5 G/T-содержащего дуплекса, использованного в PCA (рис. 3, табл. 2).

Ковалентное связывание мутантной формы MutS(A469C) с 5'-<sup>32</sup>P-меченным ДНК-дуплексом (III) проводили в буфере, содержащем 1 mM ADP, в течение 30 мин при 37°C. Для достижения максимального выхода конъюгата использовали 5-кратный избыток ДНК по отношению к белку. Как видно из изображений геля, окрашенного раствором кумасси G250, и его радиоавтографа



**Рис. 5.** Схема реакции тиол-дисульфидного обмена между остатком цистеина MutS и 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридил-дифио)пропионамидо]уридином в составе ДНК-дуплекса.

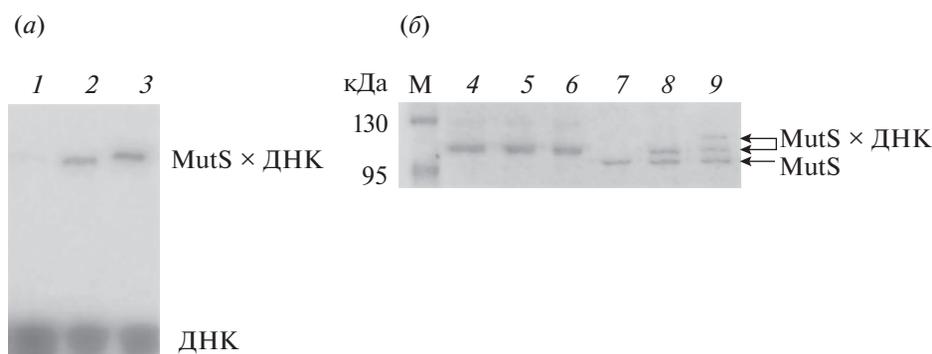


**Рис. 6.** Анализ продуктов ковалентного связывания мутантной формы MutS(A469C) и дуплекса (III) методом электрофореза в 8%-ном SDS-ПААГ. (а) – Фотография геля, окрашенного раствором кумасси G250; (б) – радиоавтограф геля. Дорожка 1 – препарат MutS(A469C) с 10 мМ DTT (а); дорожка 2 – препарат дуплекса (III); дорожки 3 и 4 – реакционные смеси в буфере А, не содержащем и содержащем 10 мМ DTT соответственно. М – маркер молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа).

(рис. 6), кроме зоны, соответствующей белку (молекулярная масса ~90 кДа), наблюдалась дополнительная зона с большей молекулярной массой (MutS × ДНК). В этой зоне обнаруживалась радиоактивность, что подтверждало наличие в ней ДНК и позволяло считать эту зону продуктом “кросслинкинга”. Из двух остатков Cys гомодимеров мутантных форм MutS только один способен образовывать ковалентную связь с реакционноспособной ДНК. Таким образом, 100%-ному выходу конъюгатов мутантных форм MutS с модифицированными ДНК в расчете на белок соответствует 50%-ная модификация этих белков. Выход конъюгата MutS(A469C) с ДНК-дуплексом (III) составлял >80%, т.к. >40% белка находилось в составе зоны, соответствующей конъюгату (рис. 6а, дорожка 3). Кроме зоны, соответствующей конъюгату MutS(A469C) с ДНК-дуплексом, наблюдалась зона с очень низкой подвижностью в 8%-ном SDS-ПААГ (>200 кДа), соответствующая димеру MutS (MutS × MutS). Образованию белок-белковой сшивки через дисульфидный мо-

стик в данном случае способствует сближение остатков Cys в гомодимере мутантной формы MutS(A469C). При добавлении 10 мМ DTT в реакционную смесь зоны, соответствующие конъюгату и димеру белка, исчезают (рис. 6, дорожки 4), что подтверждает наличие в них дисульфидной связи.

Для оценки специфичности предложенного ДНК-реактива было изучено взаимодействие дуплексов (IV)–(VI), содержащих единичный остаток 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдифио)пропионамидо]уридина, с белками CFMutS, MutS(A469C) и MutS(N497C). В качестве примера на рис. 7 приведены результаты анализа реакционных смесей для дуплекса (IV) и различных форм белка MutS. CFMutS, не содержащий остатков Cys, как и ожидалось, не образовывал ковалентный комплекс ни с одним ДНК-дуплексом (рис. 7а). Эффективности образования ковалентного связанного комплекса при оценке по белку для всех дуплексов и мутантных форм MutS(A469C) и MutS(N497C) составляла 60–100%. Тем не менее наблюдались различия в эффективности образования конъю-



**Рис. 7.** Взаимодействие WT MutS и мутантных форм CF MutS, MutS(A469C), MutS(N497C) с  $^{32}\text{P}$ -мечеными ДНК-дуплексами (IV)–(VI), содержащими единственный остаток 2'-дезоксид-2'-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]уридина. Радиоавтограф (а) и фотография (б) 8%-ного SDS-ПААГ, окрашенного раствором кумасси G250. Дорожки 1–3 – реакционные смеси, содержащие CF MutS, MutS(A469C), MutS(N497C) и дуплекс (IV) соответственно; дорожка 4 – препарат WT MutS; дорожки 5 и 6 – реакционные смеси, содержащие WT MutS и дуплекс (V) или (VI) соответственно; дорожка 7 – препарат MutS(A469C); дорожки 8 и 9 – реакционные смеси, содержащие MutS(A469C) и дуплекс (V) или (VI) соответственно. М – маркер молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа).

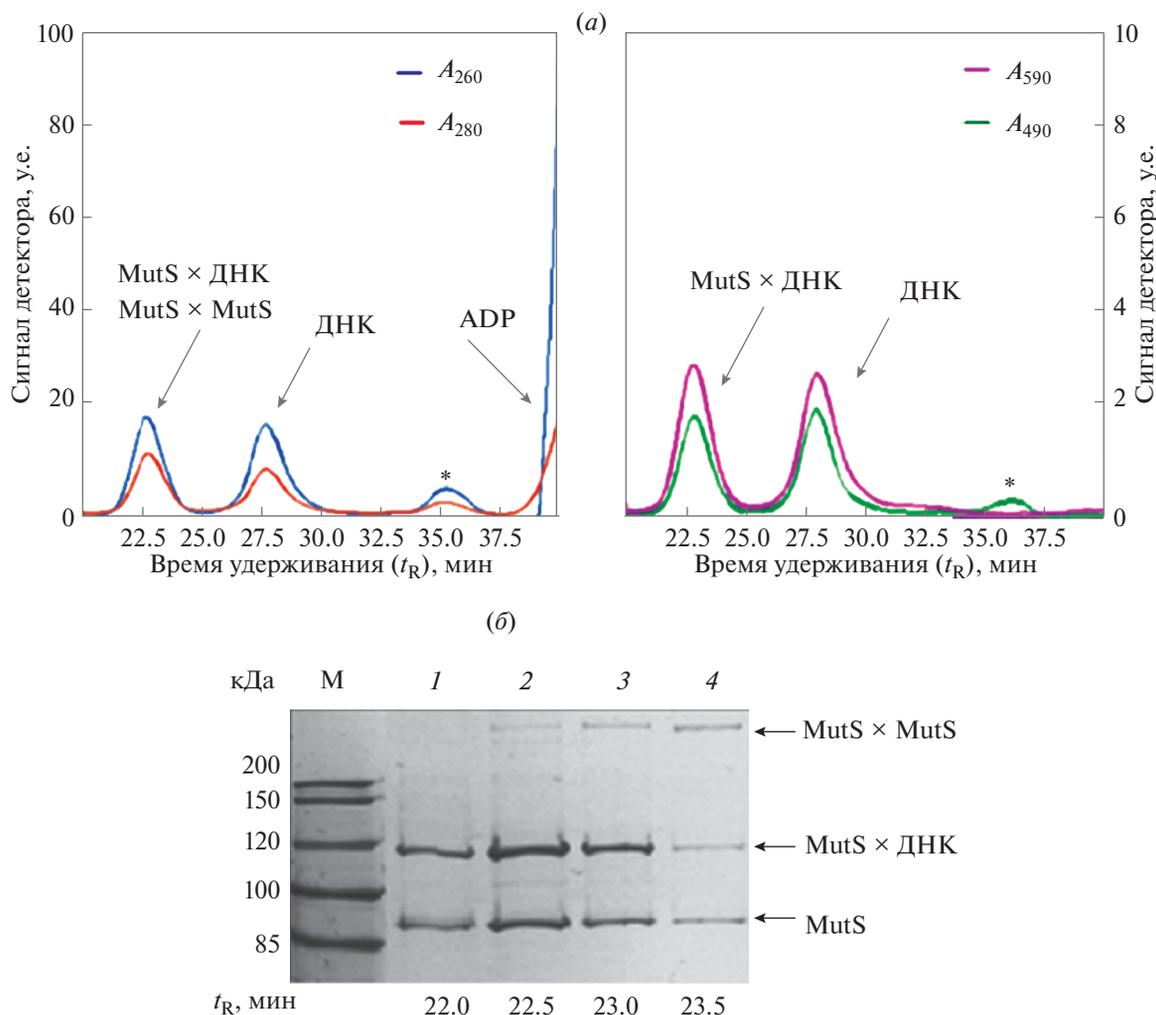
югатов для MutS(N497C) и MutS(A469C) с дуплексами (III)–(VI). Например, по данным РСА, реакционноспособная группировка ДНК-дуплекса (V) должна быть сближена с остатком 497 из субъединицы Б MutS (табл. 2, рис. 3). Образование конъюгата этого ДНК-дуплекса с мутантной формой MutS(N497C) происходило с максимальной эффективностью (90–100% по белку) и менее эффективно – с мутантной формой MutS(A469C) (60–70% по белку) (рис. 7). В условиях наших экспериментов образование ковалентного комплекса с ДНК-дуплексом (VI) канонического строения также происходило с высоким выходом (до 60% в расчете на белок). Ранее такой факт наблюдался в случае фактора транскрипции NF-κB и никующей эндонуклеазы BspD61, которые имеют высокое сродство к неспецифической ДНК [14, 15]. Этим же свойством обладает белок MutS [31, 33, 34]. Возможно, остатки Cys мутантных форм MutS сближаются с реакционноспособной группировкой ДНК в процессе поиска “мисматча” и успевают образовать с ней ковалентную связь. В случае MutS при взаимодействии с ДНК-дуплексом (VI) на геле наблюдаются несколько зон, соответствующих конъюгатам. Это связано с тем, что 17-звенный дуплекс канонического строения более устойчив по сравнению с “мисматч”-содержащим и не полностью денатурирует в условиях гель-электрофореза. Наблюдаемые продукты, по-видимому, соответствуют конъюгатам MutS с одной цепью и ДНК-дуплексом. Вместе с тем кинетический анализ реакции “кросслинкинга” MutS(A469C) с ДНК-реагентами, содержащими 3'-концевую пиридилдисульфидную группу, показал в 4 раза большую скорость образования конъюгата с “мисматч”-содержащим дуплексом по сравнению с каноническим [16]. В то же время гомодимер WT MutS, имеющий в своем составе 12 остатков Cys, не формировал конъюга-

ты с дуплексами (III)–(VI), содержащими 2'-пиридилдисульфидное звено.

В совокупности представленные в данной работе и описанные нами ранее результаты [9, 14–16] подтверждают, что для образования ковалентной связи необходимо непосредственное сближение Cys с описываемой реакционноспособной группировкой – либо в процессе сканирования ДНК, либо при образовании специфического ДНК-белкового комплекса.

**“Кросслинкинг” 45-звенного дуплекса (I) с MutS(A469C) и выделение ДНК-белкового конъюгата.** Выбранный и оптимизированный нами метод ковалентного присоединения мутантных форм MutS к 17-звенным дуплексам оказался очень эффективным. Мы использовали его для получения конъюгата 45-звенного дуплекса (I), содержащего FRET-пару, с MutS(A469C), а также для выделения полученного комплекса и проверки функциональной активности его белкового компонента.

В составе ДНК-дуплекса (I) присутствуют довольно короткие ДНК-фрагменты. Наиболее короткие из них – 15-звенный и 13-звенный, содержащий Alexa-488 – имеют расчетную температуру плавления  $\sim 44.5^\circ\text{C}$  (рассчитана в программе OligoAnalyzer, см. “Эксперим. часть”). По результатам гель-электрофореза в неденатурирующих условиях наблюдалась частичная диссоциация этих коротких дуплексов. Было подобрано молярное соотношение олигонуклеотидов, содержащих флуорофоры, при котором наблюдалась максимальная эффективность FRET, и при этом избыток 13-звенного или 15-звенного олигонуклеотида был минимален (45-мер : 13-мер = 45-мер : 15-мер = 1.0 : 1.1). Поскольку в данной работе измерялись относительные изменения флуоресценции, незначительный избыток однотяжевых ДНК, присутствовавший во всех экспериментах в равном количестве, не влиял



**Рис. 8.** Выделение конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) методом эксклюзионной ВЭЖХ на колонке с сорбентом Superdex200 ТМ. (а) – Хроматограммы смеси, содержащей ДНК-белковый конъюгат. Детектировали оптическую плотность раствора при 260, 280, 490 и 590 нм; (б) – электрофоретический анализ фракций, полученных в результате эксклюзионной хроматографии конъюгата в градиентном 4–20%-ном SDS-ПААГ. Дорожки 1–4 соответствуют временам удерживания 22.0–23.5 мин. М – маркер молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа). Гель окрашивали раствором солей серебра.

на общую тенденцию. Образование дуплекса (I) контролировали методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях, как описано в работе Ede et al. [37]. Для повышения стабильности ДНК-дуплексов их формировали и хранили в присутствии 5 мМ  $MgCl_2$ . Кроме того, эксперименты выполняли при температуре 20°C.

“Кросслинкинг” проводили в буфере А (см. “Эксперим. часть”), содержащем 1 мМ ADP, 5 мкМ ДНК-дуплекс (I) и 1 мкМ MutS(A469C). Выход продукта был близок к количественному (рис. 8). Для выделения конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) использовали эксклюзионную хроматографию с условиями разделения, описанными ранее [16]. Отметим, что выделение конъюгатов MutS с протяженным дуплексом, имеющим составную “нижнюю” цепь и флуорофоры в разных цепях, методом эксклюзионной хромато-

графии выполнено впервые. Наличие флуорофоров в составе этого дуплекса позволяет эффективно контролировать разделение компонентов и оценивать стабильность ДНК в процессе очистки. За ходом разделения следили не только при 260 и 280 нм, но и при 480 нм (поглощение Alexa-488) и 590 нм (поглощение Alexa-594). На рис. 8а приведен пример хроматограммы разделения компонентов реакции между MutS(A469C) и дуплексом (I).

Для определения состава фракций использовали соотношение  $A_{260}/A_{280}$ . Время удерживания ( $t_R$ ) конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) с массой ~200 кДа составляло ~22.5 мин ( $A_{260}/A_{280} = 1.4$ ). Время удерживания ДНК-дуплекса (I) (с массой ~30 кДа) составляло ~28 мин ( $A_{260}/A_{280} = 1.9$ ).

На хроматограмме наблюдался небольшой пик (на рис. 8а он обозначен звездочкой) с  $t_R \approx 36$  мин и увеличенным поглощением в области 488 нм. По его поглощению можно предположить, что он соответствует 13-звенному ДНК-фрагменту, содержащему флуорофор Alexa-488, т.к. значение  $A_{260}/A_{280}$  для него составляло 1.8. Как упоминалось, этот олигонуклеотид добавляли в незначительном избытке при составлении ДНК-дуплекса, что обеспечивало наиболее эффективное формирование ДНК-системы (I).

При электрофоретическом анализе образцов собранных фракций в градиентном 4–20%-ном SDS-ПААГ (рис. 8б) наблюдалось образование двух зон, соответствующих конъюгату мономера MutS(A469C) с дуплексом (I) и свободному белку в мономерной форме, а также образование зоны стабильного димера MutS(A469C), обладающего низкой подвижностью в условиях электрофореза. Во фракции пика с  $t_R = 22$  мин практически не наблюдалось примеси димера белка (рис. 8б, дорожка 1), поэтому именно эта фракция была использована в дальнейшем для функциональных исследований конъюгата. Таким образом, в ходе эксклюзионной хроматографии конъюгат MutS с ДНК был очищен от непрореагировавшей ДНК (двучепочечной ДНК и олигонуклеотидов), однако полностью отделить его от непрореагировавшего белка не удалось.

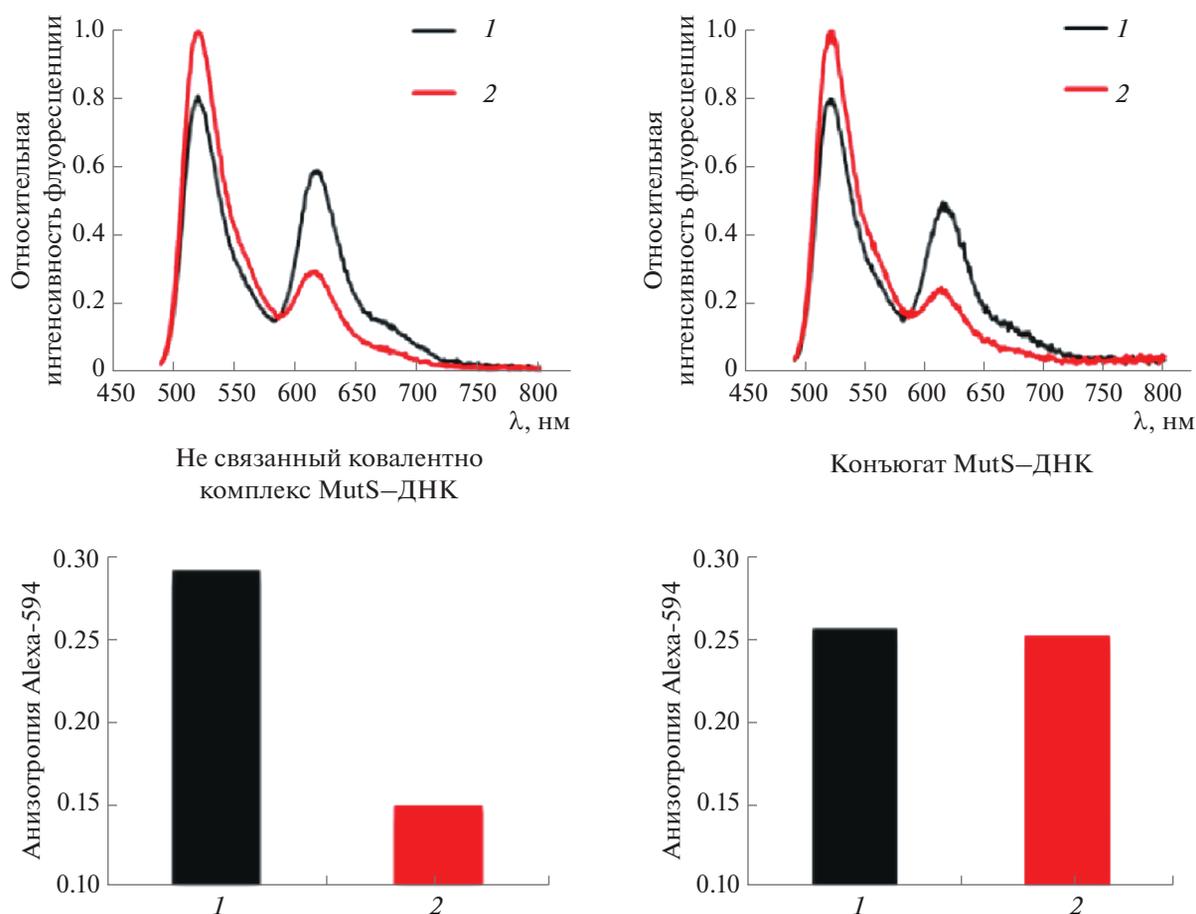
**Изменение флуоресцентных свойств дуплекса (I), ковалентно связанного с MutS(A469C), при добавлении АТР.** В следующей серии экспериментов мы использовали выделенный конъюгат дуплекса (I) с MutS(A469C) и контрольный образец – “несшитый” комплекс MutS(A469C) с дуплексом (II), который аналогичен дуплексу (I), но не содержит реакционноспособную группировку (рис. 2). Эти образцы применяли для изучения конформационных перестроек ДНК при переходе “начального” комплекса, узнающего “мисматч”, в “окончательный”, в котором MutS находится в конформации “скользящий зажим” (рис. 1). Как упоминалось выше, в ходе этого процесса, протекающего в присутствии АТР, происходит разгибание ДНК, что сопровождается значительным уменьшением эффективности переноса энергии между флуорофорами в дуплексах (I) и (II).

Для регистрации образования “начального” комплекса, узнающего некоплементарную пару, записывали спектры испускания при возбуждении Alexa-488 и определяли значения анизотропии обоих флуорофоров. В условиях контрольного эксперимента вся ДНК была связана с белком MutS(A469C): соотношение концентраций дуплекса (II) и MutS(A469C) составляло 1 : 10 в расчете на мономер белка.

Для количественной интерпретации изменений, наблюдавшихся в спектрах флуоресценции, использовали отношение  $\Delta(F_{\max}/Red)$ , где  $F_{\max}$  –

максимум интенсивности флуоресценции акцептора при возбуждении донора флуоресценции, а  $Red$  – максимум флуоресценции донора в условиях его возбуждения;  $\Delta$  указывает на изменение величины  $F_{\max}/Red$  в ходе связывания MutS с ДНК. При расчетах вычитали значения  $F_{\max}/Red$  после связывания с MutS из значений  $F_{\max}/Red$  для раствора ДНК-дуплекса. Значение  $\Delta(F_{\max}/Red)$  нивелирует эффект разведения реакционной смеси, что неизбежно в ходе эксперимента, и позволяет говорить об изменении эффективности переноса энергии между донором и акцептором флуоресценции во FRET-паре. Поскольку  $\Delta(F_{\max}/Red)$  является отношением двух значений интенсивности флуоресценции, эта величина не имеет размерности.

Из спектров флуоресценции (рис. 9, образцы 1) следует, что для конъюгата MutS(A469C) с дуплексом (I) и не связанного ковалентно комплекса MutS(A469C) с дуплексом (II) наблюдался эффективный перенос энергии между флуорофорами. Значение  $\Delta(F_{\max}/Red)$  составляло  $\sim 0.13$  для дуплексов (I) и (II), что свидетельствует о наличии в растворах “начального” комплекса, узнающего “мисматч” (где ДНК изогнута на  $60^\circ$ ) [31]. После добавления 1 мМ АТР к этим комплексам наблюдалось значительное уменьшение эффективности переноса энергии, что видно по изменению спектра флуоресценции (рис. 9, образцы 2). Значения  $\Delta(F_{\max}/Red)$  изменились до 0.012. Такое изменение эффективности переноса энергии, по видимому, свидетельствует об исчезновении изгиба ДНК, характерного для “начального” комплекса. “Скользкий зажим” MutS, формирующийся после добавления АТР, сразу диссоциирует, и ДНК-белковый комплекс разрушается (за исключением ДНК-фрагментов с заблокированными концами [26]). Именно поэтому в случае комплекса MutS(A469C) с дуплексом (II) значения анизотропии уменьшались с 0.3 до 0.15:  $\Delta r(\text{Alexa-594}) = 0.15$  (рис. 9). Однако в случае “сшитого” комплекса наблюдалось практически полное отсутствие изменения анизотропии Alexa-594:  $\Delta r(\text{Alexa-594}) = 0.01$ . Добавление в реакционную смесь восстановителя (10 мМ DTT) приводило к разрушению конъюгата (данные не приведены). Значения анизотропии флуорофоров для такого препарата, равные  $r(\text{Alexa-488}) = 0.06$  и  $r(\text{Alexa-594}) = 0.15$ , свидетельствуют о наличии в растворе свободного ДНК-дуплекса. Полученные результаты показывают, что ковалентная связь между ДНК и Cys469 в домене “зажим” белка MutS не препятствует изменению конформации белка и его переходу в “скользящий зажим” при связывании АТР. В дальнейшем важно понять, возможны ли в конъюгате MutS–ДНК другие конформационные перестройки белка, например, изменение положения “мисматч”-связывающего [38, 39] и



**Рис. 9.** Анализ конформационных перестроек ДНК при образовании “окончательного” узнающего комплекса методами, основанными на измерениях интенсивности и анизотропии флуоресценции. На верхних панелях представлены спектры испускания (в диапазоне 500–800 нм) при возбуждении Alexa-488; нижние панели – диаграммы, демонстрирующие изменение анизотропии флуорофора Alexa-594 в ходе эксперимента; 1 – конъюгат MutS(A469C) с дуплексом (I) и не связанный ковалентно комплекс MutS(A469C) с дуплексом (II); 2 – те же образцы после добавления АТФ (1 мМ).

“коннекторного” доменов [40], а также взаимодействие MutS с белком MutL [40–42].

Полученные результаты согласуются с предшествующими данными. В работе Monakhova et al. [9] ДНК содержала пиридилдисульфидную группу в 5-м положении Т, а конъюгат MutS–ДНК выделяли методом анионообменной хроматографии (препарат не содержал примеси белка). Наблюдаемые нами эффекты не противоречат общепринятой модели: в присутствии АТФ происходят конформационные изменения в MutS и “выпрямление” ДНК в белково-нуклеиновом комплексе [24].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат, наборы белков-маркеров молекулярной массы PageRuler™ (10–200 кДа), набор ДНК-маркеров GeneRuler™ 1 kb (250–10000 п.н.), раствор PageBlue™ на основе кумасси G250, ADP, АТФ (Thermo Fisher Scientific, США); *trео*-2,3-

дигидрокси-1,4-димеркаптобутан (1,4-дителиотрит, DTT);  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-АТФ с удельной радиоактивностью 1000 Кюри/моль и концентрацией 2 мкМ (ИМБ РАН, Россия); МАНТ-АДР – 2′/3′-*O*-(*N*-метилантранилоил)аденозин-5′-дифосфат (BIOLOG Life Science Institute, Германия).

**Ферменты и белки.** Т4 полинуклеотидкиназа (Thermo Fisher Scientific, США). MutS и мутантные варианты получены согласно методикам, опубликованным ранее [16, 35].

**Плазмидная ДНК (pUC-MMR),** содержащая G/T-пару и участок узнавания MutH, описана и получена согласно методике, опубликованной ранее [27].

**Олигодезоксирибонуклеотиды** 5′-GTCATCCTC-GT<sup>Alexa594</sup>CTCAGGCACCCTGGGTGCTGAGGG-CATAGGCTTG-3′ и 5′-CAAGCCTAT<sup>Alexa488</sup>GCCC-3′ синтезированы компанией Eurogentec (Бельгия). Флуорофоры Alexa-488 и Alexa-594 присоединены по С5-атому тимидина через 2-(6-аминогексилкарбамоил)виниловый линкер. Олигодезок-

сирибонуклеотиды с включениями 2'-дезоксидеокси-2'-аминоуридина получали по стандартному протоколу амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза на автоматическом синтезаторе ABI 380V (Applied Biosystems, США) с использованием 5'-*O*-диметокситритил-2'-трифторацетиламино-2'-дезоксидеокси-3'-(*N,N*-диизопропиламино)цианэтилфосфита уридина (ChemGenes, США). Немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы ЗАО "Евроген" (Россия).

**Синтез олигодезоксирибонуклеотидов с единичным 2'-дисульфид-содержащим уридиновым звеном.** Исходными соединениями для получения 2-пиридилдисульфид-содержащих олигонуклеотидов служили синтетические олигонуклеотиды с единичным 2'-амино-2'-дезоксидеоксиуридиновым звеном. Модификацию проводили согласно методике, опубликованной ранее [15]. Процент превращения исходного соединения в целевой 2-пиридилдисульфид-содержащий олигонуклеотид оценивали методом ВЭЖХ в ион-парном варианте или методом электрофореза в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

**Конструирование флуоресцентно- и <sup>32</sup>P-меченных ДНК-дуплексов.** <sup>32</sup>P-метку в олигонуклеотиды вводили с помощью полинуклеотидкиназы Т4 (10 ед. акт.) и [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (200 нМ) в 10 мкл буфера с 50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ DTT, 100 мкМ спермидина в течение 30 мин при 37°C. Непрореагировавший [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ удаляли из смеси, используя электрофорез в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, с последующим извлечением олигонуклеотида из геля. Растворы ДНК-дуплексов готовили смешиванием эквимольных количеств комплементарных олигонуклеотидов. При приготовлении составных ДНК-дуплексов использовали 10%-ный избыток 13- и 15-звенных олигонуклеотидов по отношению к 45-звенной ДНК-матрице. Смесь нагревали до 80°C и медленно охлаждали до комнатной температуры. В раствор флуоресцентно-меченных ДНК-дуплексов добавляли MgCl<sub>2</sub> до концентрации 5 мМ для повышения стабильности ДНК-дуплексов. Готовые ДНК-дуплексы хранили при 4°C.

**Кинетика обмена ADP в АТРазных доменах белка MutS и его мутантных форм.** Обмен ADP на АТФ в АТРазных доменах белка MutS изучали с использованием МАНТ-ADP. Кинетику изменения интенсивности флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Измерения проводили при комнатной температуре в кварцевой кювете (Hellma, Германия). Реакционная смесь представляла собой буфер А (25 мМ HEPES (рН 7.5), 125 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>) с 0.05% (v/v) Tween-20 и 500 нМ МАНТ-ADP, а также содержала (или не содержала) ДНК-дуплекс (VII) (концентрация 500 нМ). Добавляли MutS (или мутантную форму белка) в концентрации 500 нМ (в расчете на мономер). Зависимость

интенсивности флуоресценции от времени измеряли при  $\lambda_{\text{возб.}} = 355$  нм и  $\lambda_{\text{исп.}} = 448$  нм и напряжении детектора 600 В. После записи начального участка спектра (белок, связанный с МАНТ-ADP) в кювету добавляли ADP до концентрации 1 мМ, быстро перемешивали и продолжали записывать спектра до выхода на плато. Суммарный объем смеси составлял 75 мкл. Измерения повторяли не менее трех раз.

Кривые обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism® 5 (<http://www.graphpad.com>). Экспоненциальные участки аппроксимировали согласно уравнению, соответствующему кинетической схеме процесса:

$$I_t = (I_0 - I_\infty)e^{-kt} + I_\infty.$$

Во всех случаях коэффициент корреляции составлял >0.98.

**Активация начальных этапов репарации "мисматчей" в ДНК.** Процесс репарации, включая этап гидролиза "дочерней" цепи ДНК, наблюдали *in vitro* с использованием рекомбинантных белков MutS (дикого типа или описанных в данной работе мутантных форм), MutL и MutH. Для этого раствор рUC-MMR (25 нМ) инкубировали с MutS (400 нМ в расчете на мономер белка), а затем добавляли равный объем смеси белков MutL (400 нМ в расчете на мономер белка) и MutH (100 нМ), предварительно выдержанных с 1 мМ АТФ при 0°C. Реакцию проводили в 20 мкл в буфере А при 37°C. В интервале 1–10 мин отбирали аликвоты по 5 мкл, к которым добавляли 5 мкл раствора, содержащего 250 мМ EDTA, 50% глицерина и 0.1% красителя бромфенолового синего. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия. Фотографии гелей, полученные при облучении УФ-светом, обрабатывали с помощью программы GelAnalyser 2010A (<http://www.gelanalyzer.com>). Измеряли интенсивность зон, соответствующих ДНК с одноцепочечным разрывом.

**Ковалентное связывание белка MutS с реакционноспособными ДНК-лигандами.** "Кросслинкинг" мутантных форм MutS с различными модифицированными ДНК-дуплексами (I), (III)–(VI) проводили в буфере А, содержащем 1 мМ ADP. Концентрация мутантной формы MutS в расчете на мономер составляла 1 мкМ, концентрация ДНК-дуплекса – 5 мкМ. Продукты реакции разделяли в 6%-ном или 8%-ном денатурирующем SDS-ПААГ с 4%-ным концентрирующим слоем. При проведении реакций с <sup>32</sup>P-меченными фрагментами ДНК гель после электрофореза высушивали и закладывали в кассету BAS Cassette2 2340 с экраном, чувствительным к  $\beta$ -излучению. Электрофограммы получали с помощью прибора FLA-3000 (FujiFilm, Япония). Затем гель помещали в воду и окрашивали раствором кумасси G250 для визуализации белка. Выход конъюгата опре-

деляли денситометрически с использованием фотографий гелей, окрашенных раствором кумасси G250. Рассчитывали интенсивность зоны геля, соответствующей конъюгату, по отношению к суммарной интенсивности зон, содержащих белок в дорожке. Этот метод не позволяет получить точные данные о количестве вещества в той или иной зоне геля (ошибка ~10%), однако дает возможность проследить общую тенденцию.

**Выделение ДНК-белковых конъюгатов методом эксклюзионной хроматографии.** Конъюгаты мутантных форм MutS(A469C) и MutS(N497C) с 2-пиридилдисульфид-содержащим ДНК-дуплексом (I) выделяли с использованием системы для ВЭЖХ Elite LaChrom VWR-Hitachi L-2455 (Япония). Перед нанесением на колонку препарат конъюгата центрифугировали 15 мин при 12000 об./мин. Использовали хроматографическую колонку размерами 10 × 300 мм с сорбентом Superdex200 TM (GE Healthcare Life Sciences, США). Колонку уравновешивали буфером Б (10 мМ HEPES (pH 7.9), 1 мМ EDTA, 200 мМ KCl, 10% (v/v) глицерина), который затем служил элюентом. Объем наносимого на колонку препарата составлял 100 мкл, расход элюента – 0.5 мл/мин. За ходом разделения следили по поглощению при 260, 280, 490 и 590 нм. Рассчитывали значения  $A_{260}/A_{280}$  для элюата. При элюции белка с колонки соотношение  $A_{260}/A_{280}$  составляло 0.7, при элюции конъюгата – 1.4, при элюции ДНК – 1.9. Концентрацию белка во фракциях определяли на приборе NanoDrop ND-1000 (PecLab, США). Гомогенность конъюгата анализировали в 6%-ном SDS-ПААГ. Гель окрашивали раствором кумасси G250 или раствором солей серебра с использованием набора The PageSilver™ (Thermo Fisher Scientific, США). Раствор очищенного конъюгата хранили при 0°C. Все эксперименты с конъюгатом проводили в течение 4 ч после выделения, т.к. далее активность белка значительно уменьшалась.

**Измерение анизотропии и сигнала FRET в конъюгате MutS–ДНК.** Раствор конъюгата MutS(A469C)–ДНК (50 нМ) в 100 мкл буфера А с 0.05% (v/v) Tween-20 помещали в кварцевую кювету и измеряли сигнал флуоресценции и анизотропию для двух флуорофоров – Alexa-488 (донор) и Alexa-594 (акцептор) – на спектрофлуориметре FluoroMax-4 (Horiba, Япония) при комнатной температуре. Затем к раствору добавляли АТФ до конечной концентрации 1 мМ, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и проводили измерения повторно. В контрольном эксперименте измеряли интенсивность флуоресценции не зафиксированного ковалентно комплекса MutS–ДНК. Концентрации белка и ДНК в этом случае составляли 20 и 200 нМ соответственно. Флуорофоры возбуждали при длинах волн 470 и 575 нм (Alexa-488 и Alexa-594 соответственно). При записи спектров флуоресценции излучение детектировали в диапазоне длин волн 490–800 или 595–800 нм для доно-

ра и акцептора соответственно. Максимальное значение интенсивности флуоресценции измеряли при 535 нм для Alexa-488 и 620 нм для Alexa-594. Для измерения FRET препарат облучали светом с длиной волны 470 нм, детектировали испускание флуоресценции в диапазоне 500–800 нм (при 525 нм наблюдался максимум испускания Alexa-488, при 625 нм – максимум испускания Alexa-594,  $F_{\max}$ ). Также образец возбуждали при 575 нм и детектировали испускание флуоресценции Alexa-594 в диапазоне 600–800 нм (для вычисления значения *Red*, интенсивности испускания Alexa-594 при 625 нм). В ходе экспериментов вычисляли  $\Delta(F_{\max}/Red)$ .

**Расстояние от аминокислоты до ДНК** (от первого углеродного атома боковой цепи аминокислотного остатка (СВ) до атома С2' ближайшего нуклеотида в ДНК) в комплексах MutS–ДНК (PDB: 1W7A, 10N7 и 1E3M) определяли в программе Jmol [43] с помощью команды “measure”.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на примере двух мутантных форм MutS нами продемонстрировано, что ДНК-фрагменты с 2-пиридилдителиогруппой при С2'-атоме могут быть использованы для фиксации белка MutS через остаток цистеина, сближенный с ДНК. Высокого выхода ДНК-белкового конъюгата с последующим его выделением в количествах, необходимых для дальнейшего анализа активности MutS, удалось достигнуть благодаря следующим факторам: 1) химической природе реакционноспособной группировки, 2) правильно подобранному месту модификации в ДНК, 3) дополнительной детекции белково-нуклеинового конъюгата в ходе эксклюзионной хроматографии за счет наличия флуорофоров в ДНК. Установлено, что MutS в составе конъюгата сохраняет способность изменять свою конформацию и конформацию ДНК. Таким образом, предложенный нами дизайн конъюгатов с функционально активным белковым компонентом может быть использован для изучения последовательности и характера перестроек в белково-нуклеиновых комплексах.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доктору Р. Хайнцу (Институт биохимии, Университет Ю. Либиха, г. Гиссен, Германия) за помощь в проведении экспериментов по “кросслинкингу”.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке грантов Немецкого научно-исследовательского общества (ННИО) и РФФИ-ННИО (проекты GRK 1384 и № 14-04-91343), реализуемых в рамках образовательной программы

“Международные исследовательские группы с участием молодых ученых”.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dolinnaya N., Zubin E., Kubareva E., Zatsepina T., Oretskaya T. // *Curr. Org. Chem.* 2009. V. 13. P. 1029–1049. <https://doi.org/10.2174/138527209788680745>
2. Ilna E.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. // *Biochimie.* 2018. V. 150. P. 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.027>
3. Ide H., Nakano T., Salem A.M.H., Shoukamy M.I. // *DNA Repair.* 2018. V. 71. P. 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.024>
4. Stasińska A.R., Putaj P., Chmielewski M.K. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 95. P. 103518. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103518>
5. Wong S.S., Jameson D.M. // *Chemistry of Protein and Nucleic Acid Cross-Linking and Conjugation*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, 2011. 622 pp.
6. Khodyreva S., Lavrik O. // *DNA Repair (Amst).* 2020. V. 90. P. 102847. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102847>
7. Hyjek-Składanowska M., Stasińska A.R., Napiórkowska-Gromadzka A., Bartłomiejczak A., Seth P.P., Chmielewski M.K., Nowotny M. // *Bioorganic Med. Chem.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115741>
8. Friedhoff P., Manelyte L., Giron-Monzon L., Winkler I., Groothuizen F.S., Sixma T.K. // *Methods in Enzymology.* 2017. V. 592. P. 77–101. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.03.025>
9. Monakhova M., Ryazanova A., Hentschel A., Viryasov M., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1389. P. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.045>
10. Monakhova M., Ryazanova A., Kunetsky V., Li P., Shilkin E., Kisil O., Rao D.N., Oretskaya T., Friedhoff P., Kubareva E. // *Biochimie.* 2020. V. 171–172. P. 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.02.004>
11. Metelev V.G., Kubareva E.A., Vorob'eva O.V., Romanenkov A.S., Oretskaya T.S. // *FEBS Lett.* 2003. V. 538. P. 48–52. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00122-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00122-4)
12. Воробьева О.В., Романенков А.С., Метелев В.Г., Карягина А.С., Лаврова Н.В., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Молекуляр. биология.* 2003. Т. 37. С. 906–915. [Vorob'eva O.V., Romanenkov A.S., Metelev V.G., Kariagina A.S., Lavrova N.V., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Mol. Biol. (Mosk.).* 2003. V. 37. P. 906–915.]
13. Романенков А.С., Кисиль О.В., Зацепин Т.С., Ямскова О.В., Карягина А.С., Метелев В.Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия.* 2006. Т. 1. С. 1648–1658. [Romanenkov A.S., Kisil O.V., Zatsepina T.S., Yamskova O.V., Karyagina A.S., Metelev V.G., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Biochemistry (Mosc.).* 2006. V. 71. P. 1341–1349.] <https://doi.org/10.1134/S0006297906120091>
14. Абросимова Л.А., Самсонова А.А., Перевязова Т.А., Юнусова А.К., Артюх Р.И., Романова Е.А., Железная Л.А., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Молекуляр. биология.* 2020. Т. 54. С. 599–610. [Abrosimova L.A., Samsonova A.A., Perevyazova T.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Romanova E.A., Zheleznaya L.A., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Mol. Biol. (Mosk.).* 2020. V. 54. P. 599–610.] <https://doi.org/10.1134/S0026893320040020>
15. Metelev V., Romanenkov A., Kubareva E., Zubin E., Polouchine N., Zatsepina T., Molochkov N., Oretskaya T. // *IUBMB Life.* 2006. V. 58. P. 654–658. <https://doi.org/10.1080/15216540600981750>
16. Heinze R.J., Sekerina S., Winkler I., Biertümpfel C., Oretskaya T.S., Kubareva E., Friedhoff P. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 1861–1864. <https://doi.org/10.1039/c2mb25086a>
17. Cristóvão M., Sisamakís E., Hingorani M.M., Marx A.D., Jung C.P., Rothwell P.J., Seidel C.A.M., Friedhoff P. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. 5448–5464. <https://doi.org/10.1093/nar/gks138>
18. Warren J.J., Pohlhaus T.J., Changela A., Iyer R.R., Modrich P.L., Beese L.S. // *Mol. Cell.* 2007. V. 26. P. 579–592. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.018>
19. Biswas I., Hsieh P. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 13355–13364. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13355>
20. Natrajan G. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 4814–4821. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg677>
21. Перевозчикова С.А., Романова Е.А., Орецкая Т.С., Фридрих П., Кубарева Е.А. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. С. 18–35. [Perevoztchikova S.A., Romanova E.A., Oretskaya T.S., Friedhoff P., Kubareva E.A. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. P. 17–34.] <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-3-17-34>
22. Putnam C.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. V. 117. P. 20351–20353. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013560117>
23. Bhairosing-Kok D., Groothuizen F.S., Fish A., Dharadhar S., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 8888–8898. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz649>
24. Liu J., Hanne J., Britton B.M., Bennett J., Kim D., Lee J.-B., Fishel R. // *Nature.* 2016. V. 539. P. 583–587. <https://doi.org/10.1038/nature20562>
25. Perevoztchikova S.A., Trikin R.M., Heinze R.J., Romanova E.A., Oretskaya T.S., Friedhoff P., Kubareva E.A. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e104963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104963>
26. Hura G.L., Tsai C.-L., Claridge S.A., Mendillo M.L., Smith J.M., Williams G.J., Mastroianni A.J., Alivisatos A.P., Putnam C.D., Kolodner R.D., Tainer J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 17308–17313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308595110>

27. Heinze R.J., Giron-Monzon L., Solovyova A., Elliot S.L., Geisler S., Cupples C.G., Connolly B.A., Friedhoff P. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 4453–4463. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp380>
28. Kramer B., Kramer W., Fritz H.-J. // *Cell.* 1984. V. 38. P. 879–887. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90283-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90283-6)
29. Lamers M.H., Georgijevic D., Lebbink J.H., Winterwerp H.H.K., Agianian B., de Wind N., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 43879–43885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406380200>
30. Lebbink J.H.G., Georgijevic D., Natrajan G., Fish A., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K., de Wind N. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 409–419. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600936>
31. Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., de Wind N., Sixma T.K. // *Nature.* 2000. V. 407. P. 711–717. <https://doi.org/10.1038/35037523>
32. Groothuizen F.S., Fish A., Petoukhov M.V., Reumer A., Manelyte L., Winterwerp H.H.K., Marinus M.G., Lebbink J.H.G., Svergun D.I., Friedhoff P., Sixma T.K. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 8166–8181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt582>
33. Bjornson K.P., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 18557–18562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301101200>
34. Manelyte L., Urbanke C., Giron-Monzon L., Friedhoff P. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 5270–5279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl489>
35. Feng G., Winkler M.E. // *Biotechniques.* 1995. V. 19. P. 956–965.
36. Lebbink J.H.G., Fish A., Reumer A., Natrajan G., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 13131–13141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066001>
37. Ede N.J., Tregear G.W., Haralambidis J. // *Bioconjug. Chem.* 1994. V. 5. P. 373–378. <https://doi.org/10.1021/bc00028a016>
38. Qiu R., Sakato M., Sacho E.J., Wilkins H., Zhang X., Modrich P., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 10914–10919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505655112>
39. LeBlanc S.J., Gauer J.W., Hao P., Case B.C., Hingorani M.M., Weninger K.R., Erie D.A. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 10782–10795. <https://doi.org/10.1093/nar/gky865>
40. Groothuizen F.S., Winkler I., Cristóvão M., Fish A., Winterwerp H.H., Reumer A., Marx A.D., Hermans N., Nicholls R.A., Murshudov G.N., Lebbink J.H., Friedhoff P., Sixma T.K. // *Elife.* 2015. V. 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06744>
41. Hao P., LeBlanc S.J., Case B.C., Elston T.C., Hingorani M.M., Erie D.A., Weninger K.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. P. 17775–17784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918517117>
42. Liu J., Lee R., Britton B.M., London J.A., Yang K., Hanne J., Lee J.-B., Fishel R. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 5294. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13191-5>
43. Herráez A. // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2006. V. 34. P. 255–261. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034042644>

## DNA with a 2-Pyridyldithio Group at the C2' Atom – a Promising Tool for the Crosslinking of the MutS Protein which Keeps Its Functional Activity

S. A. Perry\*, E. A. Kubareva\*, M. V. Monakhova\*, #, R. M. Trikin\*\*, E. M. Kosaretskiy\*, E. A. Romanova\*, V. G. Metelev\*, P. Friedhoff\*\*\*, and T. S. Oretskaya\*

#Phone: +7 (495) 939-31-48; e-mail: monakhovamv@gmail.com

\*Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Department of Chemistry and Department of Bioengineering and Bioinformatics, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

\*\*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya 8, str. 2, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*Institute for Biochemistry, FB 08, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 58, Giessen, D-35392 Germany

Non-covalent interactions between DNA and proteins are vital for the cells. DNA-protein crosslinking may occur due to various endogenous and exogenous factors, as well as chemotherapeutic agents, and often affects the performance of DNA-binding proteins. Oligodeoxyribonucleotides with a reactive group can serve as a tool to investigate the structure and mechanism of action of DNA-binding proteins. Here, we report the crosslinking of MutS – the sensor protein of DNA mismatch repair (MMR) in *Escherichia coli* – via the protein's cysteine. For this, we used DNA that harbours a 2'-deoxy-2'-[3-(2-pyridyldithio)propionamide] group as part of a nucleoside at a given position, and two fluorophores. The proposed DNA duplex consists of complementary oligonucleotides with breaks in the top and bottom strands. This feature allows to introduce the reactive group at different positions. Because of this, it is necessary to synthesise only the central fragment of the DNA with a minimal length. The MutS–DNA conjugate was obtained by thiol-disulphide exchange with quantitative yield and separated from the unreacted DNA by size exclusion chromatography. Fluorescence resonance energy transfer was used to show that MutS remained functionally active within the conjugate, since the protein was able to change its conformation and DNA conformation.

*Keywords:* reactive DNA, DNA-protein crosslinking, thiol-disulphide exchange, mismatch repair (MMR), MutS



УДК 577.113.(7+4)

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ДНК И РНК

© 2021 г. А. А. Ломзов\*, #, М. С. Купрюшкин\*, Е. С. Дюдеева\*, Д. В. Пышный\*.\*

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

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.

После доработки 12.10.2020 г.

Принята к публикации 13.10.2020 г.

Проведено исследование структуры и термической стабильности комплексов РНК и ДНК с фосфорилгуанидиновыми олигонуклеотидами (ФГО), содержащими модифицированные фосфатные группы, в которых по атому фосфора введены остатки 1,3-диметилимидазолидин-2-имина. Замещение отрицательно заряженного атома кислорода в структуре межнуклеозидного фосфатного остатка олигодезоксирибонуклеотида электронеутральным остатком тетраалкил-замещенного гуанидина не приводит к значительному изменению конформации ФГО/РНК-дуплекса в сравнении с нативным ДНК/РНК-комплексом. Вторичная структура типична для А-формы двойной спирали гибридных комплексов и отличается от таковой РНК/РНК-дуплекса. Введение модификаций приводит к снижению термостабильности ФГО/РНК-комплексов в стандартных условиях (1.01 М Na<sup>+</sup>, нейтральные значения pH). Величина дестабилизации слабо зависит от нуклеотидного контекста, в котором находится модификация, и в среднем снижает термостабильность на 1.2°C при модификации одного остатка фосфорной кислоты. Дуплексы полностью замещенных ФГО с ДНК обладают термостабильностью, не зависящей от концентрации катионов в растворе, а в случае ФГО/РНК наблюдается значимое снижение термостабильности (~6°C) при переходе от стандартных условий к деионизованной воде (Milli-Q). Для сравнения, нативные дуплексы при таком изменении буферных условий снижают термостабильность более чем на 40°C. Изменения в термостабильности при введении модификаций обусловлены изменениями в величинах энтальпии и энтропии комплексообразования.

*Ключевые слова:* аналоги нуклеиновых кислот, модифицированные олигонуклеотиды, фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды, термическая стабильность, дуплекс

DOI: 10.31857/S0132342321020159

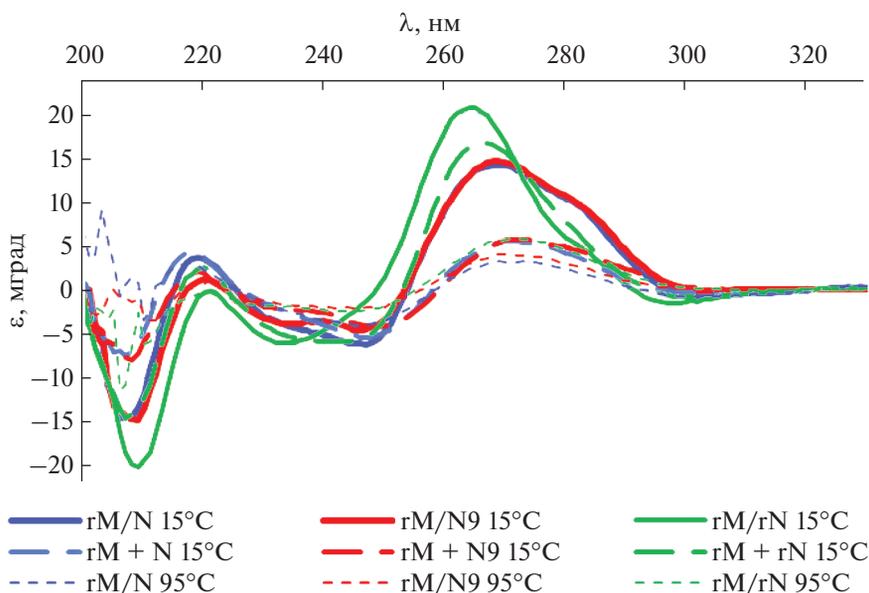
### ВВЕДЕНИЕ

Производные и аналоги нуклеиновых кислот активно разрабатывают и используют уже более четырех десятилетий [1–3]. Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) [4, 5] показали себя как перспективные аналоги нуклеиновых кислот в различных областях применения [6–11]. Их использовали для изучения молекулярно-биологических процессов [6–8], в качестве сенсорных элементов биосенсоров [9], а также потенциальных терапевтических агентов [10, 11]. Широкое применение ФГО основано на способности формировать комплексы с комплементарными по-

следовательностями ДНК или РНК. Эффективность их комплексообразования с ДНК нами была исследована ранее [12, 13]. Было установлено, что термостабильность модифицированных дуплексов зависит от таких факторов, как число модификаций, нуклеотидная последовательность, ионная сила раствора. В случае полностью модифицированной цепи гибридационные свойства ФГО практически не зависят от ионной силы раствора. Было показано, что не происходит изменения вторичной структуры как олигодезоксирибонуклеотида, так и его комплекса даже при полной модификации всех фосфатных остатков в дуплексе. С использованием методов молекулярного моделирования мы показали, что главным движущим фактором, вызывающим изменения в эффективности комплексообразования ФГО, является изменение сольватации модифицированного фосфатного остатка [13]. Для комплексов ФГО/РНК ранее не было проведено исследований, направленных на изучение влияния ФГ-групп на эф-

Сокращения: DMI – остаток N,N,N',N'-замещенного гуанидина (1,3-диметилимидазолидин-2-имина); ESI – ионизация распылением в электрическом поле; БЛМ – бислоидная липидная мембрана; ФГ – фосфорилгуанидин; ФГО – фосфорилгуанидиновый олигонуклеотид.

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-35; эл. почта: lomzov@niboch.nsc.ru; pyshnyi@niboch.nsc.ru).



**Рис. 1.** Спектры кругового дихроизма смеси олигонуклеотидов (rM/N, rM/N9, rM/rN) и сумма спектров одноцепочечных олигонуклеотидов (rM + N, rM + N9, rM + rN) при 15 и 95°C.

фективность формирования дуплексных структур с РНК.

В данной работе методом спектроскопии кругового дихроизма проведена сравнительная характеристика комплексов фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с РНК. Показано, что структура А-формы двойной спирали не изменяется даже при полной модификации олигодезоксирибонуклеотидов. Установлено эффективное формирование комплексов ФГО с РНК. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала показано, что влияние модификации на термическую стабильность дуплексов слабо зависит от нуклеотидной последовательности. Введение модификаций в структуру дуплекса приводит к снижению зависимости его термостабильности от ионной силы раствора. В отличие от полностью модифицированного ФГО-дуплекса с ДНК, для комплексов с РНК наблюдается заметное снижение термостабильности при понижении ионной силы раствора. Изменения в величинах термодинамических параметров имеют как энтропийный, так и энтальпийный вклад.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Модельная система.** Проведенные ранее исследования показали зависимость термической стабильности комплексов ФГО с ДНК от количества модификаций и нуклеотидной последовательности, в которую они введены. Поэтому для исследований был выбран набор из одного нативного и 13 модифицированных олигонуклеотидов с одинаковой нуклеотидной последовательностью, со-

держащих модифицированные фосфатные группы, в которых по атому фосфора введен остаток  $N,N,N',N'$ -замещенного гуанидина (1,3-диметилмидазолидин-2-имина, ДМИ). Рассматривали их взаимодействие с комплементарными последовательностями ДНК и РНК. Нуклеотидные последовательности использованных в работе олигомеров представлены в табл. 1.

**Характеризация вторичной структуры комплексов ФГО с РНК и ДНК.** Исследование влияние ДМИ-модификаций на структуру комплексов ФГО с ДНК (dM) и РНК (rM) методом спектроскопии кругового дихроизма проводили с использованием нативных (N или rN) и полностью модифицированного (N9) олигонуклеотидов. Регистрировали спектры отдельных олигонуклеотидов и их смесей при температурах 15 и 95°C в стандартных условиях (1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия, нейтральные значения pH). КД-спектры смеси олигонуклеотидов при высокой температуре совпадали с суммой спектров отдельных олигонуклеотидов (*данные не приведены*). Это свидетельствует об отсутствии взаимодействия олигонуклеотидов при 95°C.

При низкой температуре амплитуды полос КД-спектров как смеси олигонуклеотидов, так и отдельных олигомеров существенно увеличиваются (рис. 1). В случае суммы спектров отдельных олигомеров N и N9 с РНК (rM) наблюдается увеличение амплитуды как положительной (максимум ~270 нм), так и отрицательной полосы (минимум ~245 нм) в 1.5–2 раза. Для двух цепей РНК наблюдается более существенное увеличение амплитуды сигнала КД – в 3 раза. Спектры смеси олиго-

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности исследованных олигонуклеотидов и термодинамические параметры формирования комплексов в стандартных условиях (1 М NaCl, 10 mM какодилат натрия, нейтральные значения pH)

| Код | Последовательность<br>(5' → 3') | n | rM  |   |   | dM                   |   |   | T <sub>пл</sub> , °C | ΔG <sub>37</sub> <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> | ΔH <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> | ΔS <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> | T <sub>пл</sub> , °C |
|-----|---------------------------------|---|---|---|---|----------------------|---|---|----------------------|---|---|---|----------------------|
|     |                                 |   | ΔH <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> | ΔS <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> | ΔG <sub>37</sub> <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> | T <sub>пл</sub> , °C | ΔH <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> | ΔS <sup>o</sup> , ккал моль <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> |                      |   |   |   |                      |
| N   | d(GCGCCAAACA)                   | 0 | -71.7                                     | -196  | -11.0   | 52.7                 | -78.2                                     | -211  | -12.6                | 58.6  |   |   |                      |
| N31 | d(G*CGC*CAA*ACA)                | 3 | -74.9                                     | -205  | -11.5   | 54.4                 | -75.9                                     | -207  | -11.6                | 54.8  |   |   |                      |
| N32 | d(G*CGCC*AAAC*A)                | 3 | -72.6                                     | -201  | -10.2   | 49.1                 | -74.9                                     | -203  | -11.9                | 56.2  |   |   |                      |
| N4  | d(GC*GC*CA*AA*CA)               | 4 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | -76.0                                     | -208  | -11.5                | 53.9  |   |   |                      |
| N51 | d(G*CG*CC*AA*AC*A)              | 5 | -73.5                                     | -206  | -9.7  | 46.3                 | -86.2                                     | -238  | -12.4                | 55.6  |   |   |                      |
| N52 | d(G*C*GCCAA*A*C*A)              | 5 | -64.6                                     | -178  | -9.5  | 46.7                 | -85.8                                     | -236  | -12.5                | 55.9  |   |   |                      |
| N53 | d(G*C*G*C*C*AAACA)              | 5 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | -84.5                                     | -233  | -12.1                | 54.6  |   |   |                      |
| N54 | d(GCGCC*A*A*A*C*A)              | 5 | -64.5                                     | -177  | -9.6  | 47.1                 | -85.0                                     | -234  | -12.2                | 55.2  |   |   |                      |
| N55 | d(G*C*GCC*AAA*C*A)              | 5 | -71.5                                     | -200  | -9.6  | 46.4                 | -72.5                                     | -201  | -10.1                | 48.3  |   |   |                      |
| N56 | d(G*CG*CC*AA*AC*A)              | 5 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | -77.7                                     | -214  | -11.4                | 53.5  |   |   |                      |
| N57 | d(G*C*GCC*A*AA*AC*A)            | 5 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | -73.6                                     | -201  | -11.2                | 53.4  |   |   |                      |
| N61 | d(G*C*G*CCAA*A*C*A)             | 6 | -65.5                                     | -182  | -9.1  | 44.6                 | -77.5                                     | -214  | -11.2                | 52.5  |   |   |                      |
| N62 | d(GC*G*CC*A*AA*C*A)             | 6 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | -75.9                                     | -209  | -11.1                | 52.5  |   |   |                      |
| N9  | d(G*C*G*C*C*A*A*A*C*A)          | 9 | -65.0                                     | -183  | -8.3  | 40.9                 | -70.7                                     | -196  | -10.0                | 48.4  |   |   |                      |
| rN  | r(GCGCCAAACA)                   | 0 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | H/a                                       | H/a   | H/a                  | H/a   |   |   |                      |
| dM  | d(TGTTTGGCGC)                   | 0 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | H/a                                       | H/a   | H/a                  | H/a   |   |   |                      |
| rM  | r(UGUUUGCGC)                    | 0 | H/a                                       | H/a   | H/a   | H/a                  | H/a                                       | H/a   | H/a                  | H/a   |   |   |                      |

\* Положение остатка фосфорной кислоты, модифицированного остатком DM1.

n – число модифицированных звеньев; H/a – не анализировали. Величины ошибки определения ΔH<sup>o</sup> и ΔS<sup>o</sup> не превышали 10%, ΔG<sub>37</sub><sup>o</sup> – 7%, T<sub>пл</sub> – 0.2°C.

нуклеотидов обладают более высокой амплитудой сигнала, нежели сумма спектров олигомеров при низкой температуре. Для комплексов ДНК и ФГО амплитуда положительной полосы в 2.5 раза больше, а для РНК/РНК – на  $\sim 1/4$  больше. Это свидетельствует об образовании межмолекулярных комплексов. Спектры КД всех комплексов при низкой температуре характерны для А-формы двойной спирали [14, 15]. Наблюдается положительная полоса с максимумом в районе 260 нм, отрицательная полоса существенно меньшей амплитуды в районе 240 нм и отрицательная полоса высокой интенсивности в районе 210 нм. Формирование двойной спирали ДНК/РНК-гибридами, с конформацией, типичной для А-формы, хорошо известно [13, 14]. Спектры РНК-комплексов нативного (гМ/Н) и модифицированного (гМ/Н9) олигонуклеотидов близки между собой при 15 и 95°C. Небольшое отличие наблюдается только в области длин волн  $< 250$  нм, где свой вклад может внести ФГ-группировка [12, 13, 16]. Такое совпадение говорит о близости вторичных структур нативных и модифицированных ДНК/РНК-дуплексов. Спектры РНК/РНК характерны для семейства А-форм и отличаются от ДНК/РНК как при низких, так и при высоких значениях температур. В спектрах ДНК/РНК гибридных комплексов гМ/Н и гМ/Н9 наблюдается “плечо” в области 270–280 нм, которое в случае РНК/РНК-комплекса гМ/гН существенно менее выражено. Это свидетельствует скорее о нуклеотидной природе данных особенностей КД-спектров, а не о существовании смеси А- и В-форм для гибридных комплексов. Для строгого доказательства данного утверждения необходимы дополнительные исследования.

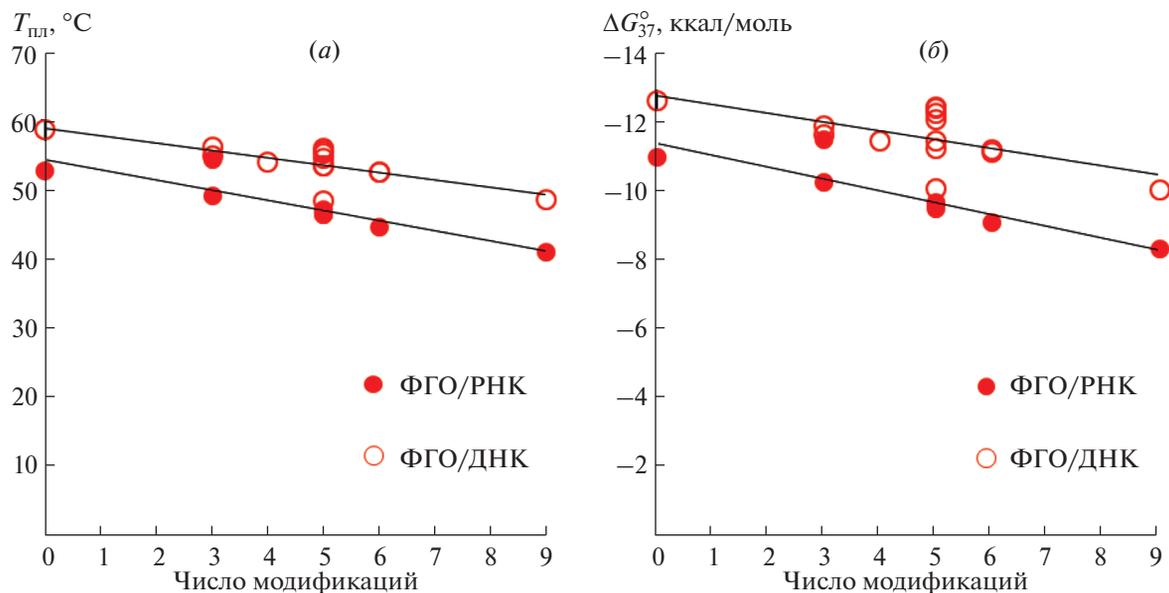
Ранее мы показали, что в случае как одноцепочечных ФГО, так и их комплексов с ДНК значимых изменений В-формы двойной спирали при введении модификации не происходит [12, 13, 16]. Таким образом, при формировании комплексов полностью замещенных ФГО с нуклеиновыми кислотами происходит формирование дуплексов, конформация которых близка к А-форме двойной спирали немодифицированных комплексов.

**Гибридационные свойства ФГО в стандартных условиях.** Первичную характеристику термостабильности комплексов производных нуклеиновых кислот проводили в стандартных условиях (1 М NaCl, буфер с нейтральным значением pH). Это связано с необходимостью экранировать отрицательный заряд остатков фосфорной кислоты нативных олигомеров с помощью катионов. При таких условиях наблюдается максимальная термостабильность межмолекулярных комплексов нуклеиновых кислот. Мы исследовали термостабильность ДНК/РНК- и ФГО/РНК-дуплексов декамеров, несущих различное число модификаций в различных положениях (табл. 1), в стандартных

условиях методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Значения термодинамических параметров, определенных в соответствии с моделью двух состояний, приведены в табл. 1. Термическая стабильность модифицированных ДНК/РНК- и ДНК/ДНК-дуплексов ниже, чем нативного дуплекса, и зависит от числа модификаций в цепи и их положения. Максимальное снижение термостабильности наблюдается для полностью модифицированного дуплекса и составляет 11.7 и 10.2°C, а в терминах свободной энергии Гиббса (при 37°C,  $\Delta G_{37}^{\circ}$ ) – по 2.6 ккал/моль для ДНК/РНК- и ДНК/ДНК-дуплексов соответственно. В зависимости от нуклеотидного контекста наблюдается незначительная вариация термостабильности. Например, для ФГО/РНК-комплексов, содержащих пять модификаций в различных положениях (олигомеры N51–N57), температура плавления находится в пределах 46.3–47.1°C. Эта разница в 2 раза выше величины экспериментальной ошибки, что свидетельствует о достоверности наблюдаемой зависимости от нуклеотидного состава. В случае ДНК/ДНК-дуплексов вариации в термостабильности несколько выше (48.3–55.9°C). Температура плавления комплексов и свободная энергия Гиббса комплексообразования линейно зависят от числа модификаций для обоих типов дуплексов (рис. 2). В среднем уменьшение термостабильности в расчете на одну модификацию происходит на  $(-1.2 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}$  и  $(+0.28 \pm 0.16)$  ккал/моль в ДНК/РНК-дуплексах, а также на  $(-1.0 \pm 0.4)^{\circ}\text{C}$  и  $(+0.22 \pm 0.13)$  ккал/моль в ДНК/ДНК-аналогах. Ранее определенные величины для полностью замещенных окта-, дека- и додекамеров показывали увеличение  $\Delta G_{37}^{\circ}$  на 0.26–0.40 ккал/моль для ФГО/ДНК-дуплексов [13].

В обоих типах комплексов введение модификаций приводит к изменению как энтропии, так и энтальпии гибридизации. При этом незначительно превалирует изменение энтальпийного вклада, что коррелирует с полученными ранее данными для ДНК/ДНК-дуплексов различной длины и GC-состава [13]. Для исследованных дуплексов не удалось выявить достоверной зависимости дестабилизирующего вклада модификации от динуклеотидного шага, в который она введена. Необходимо скрининг большего числа различных модифицированных олигомеров с увеличенной представленностью модифицированных динуклеотидов для статистически достоверного определения величин энергетических поправок, связанных с введением ФГ-групп.

Полученные результаты показывают, что введение ФГ-модификаций приводит к снижению термостабильности их дуплексов и незначительно зависит от нуклеотидного контекста, в который помещены модификации. Данный эффект более выражен в случае гибридных ФГО/РНК-,



**Рис. 2.** Зависимость температуры плавления (а) и свободной энергии Гиббса формирования комплексов (б) нативного и ФГ-олигонуклеотидов с ДНК (окружности) и РНК (залитые окружности) от числа модификаций в цепи в стандартных условиях. Концентрация дуплекса 10 мкМ.

чем ФГО/ДНК-дуплексов: разница в снижении свободной энергии Гиббса от введения каждой модификации в среднем ниже на 25%. Он обусловлен как энтропийным, так и энтальпийным вкладами, с незначительным превалированием последнего.

**Влияние ионной силы на гибридационные свойства ФГО.** Зачастую использование модифицированных олигонуклеотидов происходит в буферных условиях, значительно отличающихся от стандартных. Например, в биосенсорах на основе структур “кремний на изоляторе” (КНИ-транзисторы) для детекции РНК было предложено использовать деионизованную (Milli-Q) воду [9]. Изучение работы ферментов проводят в условиях, близких к физиологическим [6–8]. Мы провели сравнительное исследование термостабильности комплексов ФГО с ДНК и РНК при различных буферных условиях и определили величины термодинамических параметров ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta G_{37}^\circ$  и  $T_{пл}$ ). Анализ величин температур плавления комплексов ФГО с РНК и ДНК показывает, что для каждого из типов условий (вода Milli-Q, 10 мМ, 110 мМ или 1.01 М  $\text{Na}^+$ ) наблюдается близкая к линейной зависимость температуры плавления от числа модификаций в цепи (рис. 3). В стандартных условиях термостабильность ФГО-комплексов ниже, чем нативных. При концентрации ионов натрия 110 мМ модификация сахарофосфатного остова приводит к слабой дестабилизации комплексов с РНК, а в случае с ДНК термостабильность практически не зависит от наличия ФГ-групп. В растворах с более низкой ионной силой нейтрализа-

ция остова приводит к меньшему отталкиванию взаимодействующих цепей при комплексообразовании и, как следствие, к увеличению термостабильности ДНК- и РНК-дуплексов с ФГО относительно немодифицированных комплексов.

Термостабильность нативных РНК/ДНК- и ДНК/ДНК-дуплексов сильно снижается при переходе от стандартных условий к деионизованной воде, и падение температур плавления составляет 47.1 и 40.1°C соответственно (рис. 4). Для полностью модифицированной цепи в комплексе с ДНК (dM/N9) такое изменение незначительно и составляет всего 0.8°C. В противоположность этому олигомер N9 с РНК имеет значимую зависимость от ионной силы раствора: термостабильность комплекса с РНК (rM/N9) понижается на 5.8°C при переходе от стандартных условий (1.01 М  $\text{Na}^+$ ) к деионизованной воде. Общий анализ показывает, что в случае частично или полностью модифицированной цепи температура плавления ФГО/ДНК-комплекса близка к таковой при 110 мМ  $\text{Na}^+$  в растворе (рис. 3 и пересечение графиков на рис. 4). Комплексы ФГО/РНК также имеют подобную точку. Ее можно определить путем экстраполяции кривых зависимости термостабильности от концентрации катионов на рис. 4. В этом случае точка пересечения зависимостей для нативного и модифицированного дуплексов окажется в районе 50 мМ  $\text{Na}^+$ .

Анализ величин энтальпии и энтропии комплексообразования показывает, что при 0.11 и 1.01 М  $\text{Na}^+$  в растворе преобладает изменение первой из данных компонент при введении модифи-

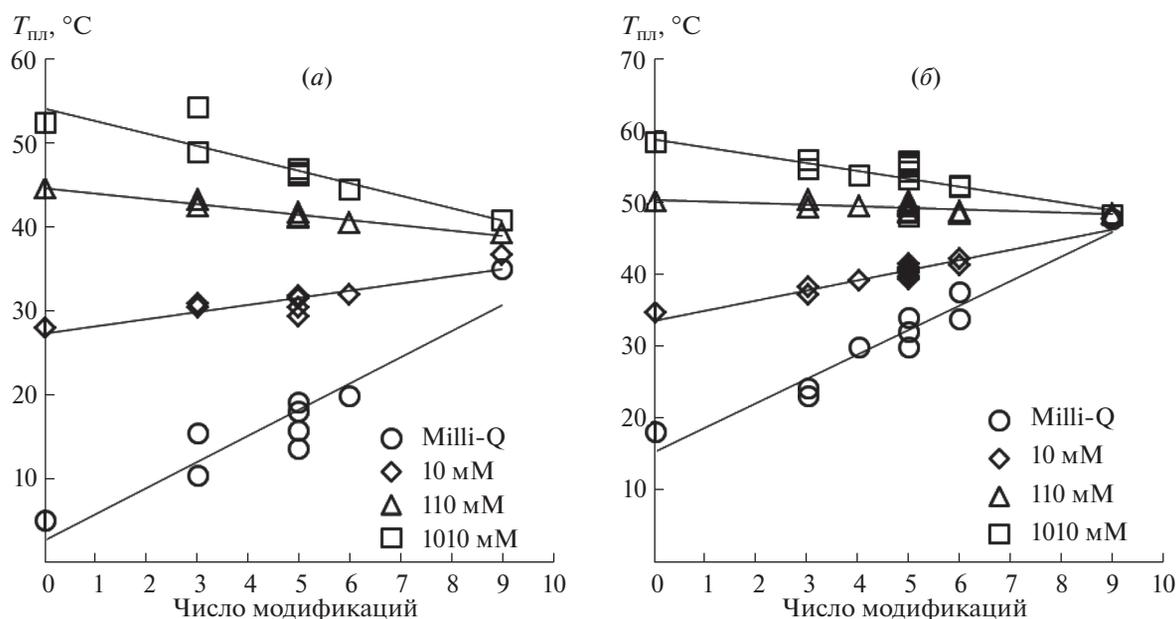


Рис. 3. Зависимость температуры плавления комплексов нативного и ФГ-олигонуклеотидов с РНК (а) и ДНК (б) от числа модификаций в цепи при различной концентрации ионов натрия. Концентрация дуплекса 10 мкМ.

каций в дуплекс. При более низкой ионной силе раствора происходит снижение термостабильности нативных комплексов, главным образом за счет увеличения энтропийной составляющей. В совокупности с уменьшенной или отсутствующей зависимостью термостабильности ФГО-содержащих комплексов от ионной силы раствора, это приводит к тому, что энтропийный вклад оказывается доминирующим. Вместе с тем наблюдаются компенсаторные эффекты обоих типов вкладов – линейная зависимость величин изменения термодинамических параметров гибридизации при введении модификации при каждой ионной силе раствора (рис. 5) [17, 18]. Несколько больший по амплитуде энтальпийный эффект наблюдается для ФГО/ДНК-дуплексов (12%), чем для ФГО/РНК-дуплексов (4%).

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез олигонуклеотидов.** Синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе ASM800 (Биоссет, Россия) согласно стандартному протоколу 2-цианэтильного фосфитамидного метода, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и соответствующие пористые стекла (Glen Research, США). Олигорибонуклеотиды (гМ и гН) были любезно предоставлены М.И. Мещаниновой (лаборатория химии РНК, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). Олигонуклеотиды, содержащие ФГ-звенья, синтезированы по ранее опубликованному протоколу [4, 5] и любезно предоставлены ООО “Нооген” (Россия).

**Хроматография.** Выделение олигонуклеотидов осуществляли методом оФВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 series (Agilent, США), как описано ранее [12]. Для элюции использовали колонку

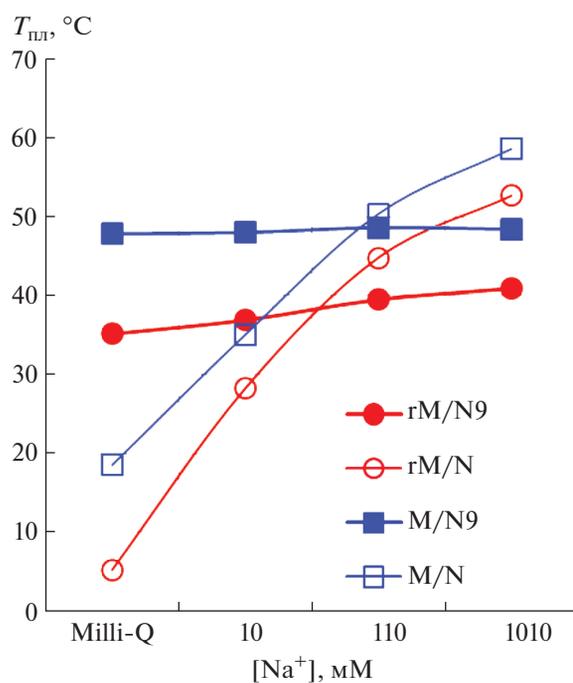


Рис. 4. Зависимость температуры плавления комплексов от концентрации ионов натрия в растворе для комплексов dM/N (синие квадраты), dM/N9 (заполненные синие квадраты), gM/N (красные окружности) и gM/N9 (заполненные красные окружности).

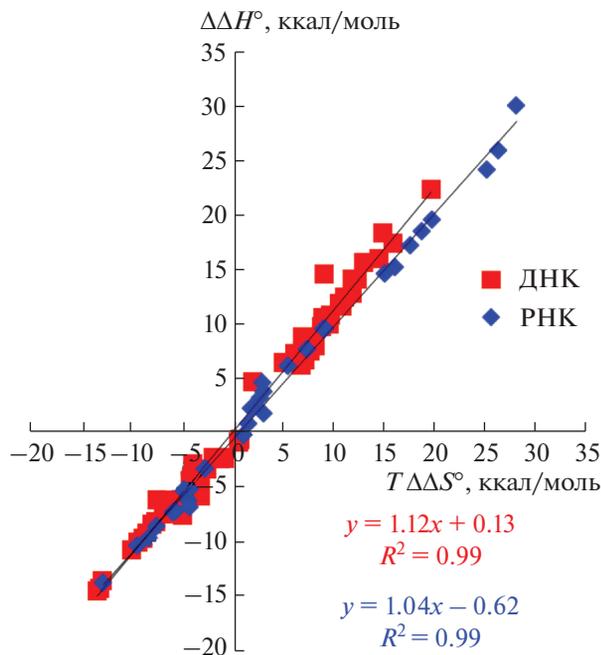


Рис. 5. Корреляция изменений энтальпии и энтропии комплексообразования при введении модификаций при различных ионных силах раствора для всех исследованных комплексов.

( $4.6 \times 150$  мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм) (Agilent, США) и линейный градиент концентрации ацетонитрила (0–90%) в 0.02 М водном растворе триэтиламмоний ацетата за 30 мин, скорость потока 1.5 мл/мин. Детекцию интенсивности оптического поглощения осуществляли на длинах волн 280 и 600 нм (в качестве базовой линии).

**Измерение концентрации олигонуклеотидов.** Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрическим методом, измеряя оптическое поглощение водных растворов на спектрофотометре UV-2100 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 200–400 нм при комнатной температуре. Коэффициент молярного поглощения нативных и модифицированных олигонуклеотидов определяли, используя значения коэффициентов молярного поглощения моно- и динуклеотидов, входящих в состав последовательности [19]. Коэффициенты молярного поглощения на длине волны 260 нм для ДНК и ФГО считали равными [13].

**Спектроскопия кругового дихроизма.** КД-спектры регистрировали, используя спектрополяриметр J-600 (Jasco, Япония) в диапазоне длин волн от 200–330 нм с разрешением 0.2 нм, шириной щели 1 нм, временем интегрирования 1 с, скоростью сканирования 50 нм/мин. Пять повторных измерений были усреднены. Для измерений использовали растворы олигонуклеотидов и их комплексов в концентрации 10 мкМ в буфере, содержащем 10 мМ какодилат натрия ( $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$

(сокр. CacNa), 1 М NaCl (pH 7.2). Образцы помещали в кварцевую терморегулируемую кювету с длиной оптического пути 1 см. Температуру образцов регулировали, прокачивая через кювету носитель жидкостного термостата-циркулятора LKB 2219 Multiterm II Water Bath (LKB, Швеция).

**Термическая денатурация комплексов нуклеиновых кислот.** Термическую денатурацию олигонуклеотидных комплексов проводили, используя спектрофотометр Cary 300 Bio (Varian, Австралия), оснащенный терморегулируемым шестисекционным кюветодержателем. Термическую стабильность комплексов определяли в водных растворах одного из следующих составов: 1) деионизованная вода (Milli-Q, 18 МОм); 2) 10 мМ CacNa, pH 7.2; 3) 10 мМ CacNa, 100 мМ NaCl, pH 7.2; 4) 10 мМ CacNa, 1 М NaCl, pH 7.2.

Олигонуклеотиды смешивали в эквимольном количестве, помещали в буферный раствор (концентрация дуплекса 10 мкМ), после чего осуществляли нагрев и охлаждение в диапазоне 5–95°C со скоростью 0.5°C/мин, регистрируя изменение оптического поглощения растворов на длинах волн 260, 270 и 300 нм с шагом 0.1°C. Оптическое поглощение на длине волны 300 нм использовали в качестве контрольного и вычитали данную “базовую линию” [20]. Термодинамические параметры – изменения энтропии ( $\Delta S^\circ$ ), энтальпии ( $\Delta H^\circ$ ) и свободной энергии Гиббса (при 37°C,  $\Delta G_{37}^\circ$ ) определяли в соответствии с моделью двух состояний [21–23], используя методы нелинейной аппроксимации теоретической кривой к экспериментальным значениям. Температуру плавления ( $T_{\text{пл}}$ ) определяли как температуру, при которой доли одно- и двухцепочечного состояния равны между собой, и рассчитывали, используя значения термодинамических параметров. Полученные данные на разных длинах волн и при нагреве/охлаждении усредняли. Величины ошибки определения  $\Delta H^\circ$  и  $\Delta S^\circ$  не превышали 10%,  $\Delta G_{37}^\circ$  – 7%,  $T_{\text{пл}}$  – 0.2°C.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые проведено изучение структуры и детальный термодинамический анализ гибридных свойств фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с РНК. Показано, что замещение отрицательно заряженного атома кислорода в структуре межнуклеозидного фосфата электронейтральным остатком тетраалкил-замещенного гуанидина – 1,3-диметилимидазолидин-2-имина (DMI) – не приводит к изменению конформации ФГО/ДНК-дуплекса в сравнении с нативным гибридным ДНК/РНК-аналогом. Вторичная структура типична для А-формы двойной спирали гибридных комплексов и отличается от РНК/РНК-дуплекса.

Введение модификаций приводит к снижению термостабильности ФГО/РНК-комплексов в стандартных условиях ( $1.01 \text{ M Na}^+$ , нейтральные значения pH). Величина дестабилизации слабо зависит от нуклеотидного контекста, в котором находится модификация, и в среднем снижает термостабильность на  $1.2^\circ\text{C}$  на один модифицированный фосфатный остаток. Аналогичная величина для ДНК составляет  $1.0^\circ\text{C}$ . ФГ-олигомеры обладают менее выраженной зависимостью гибридных свойств от ионной силы раствора, чем их ДНК-предшественники. Дуплексы полностью замещенных олигомеров с ДНК обладают термостабильностью, не зависящей от наличия и концентрации катионов в растворе. В случае ФГО/РНК-комплексов наблюдается значимое снижение термостабильности ( $\sim 6^\circ\text{C}$ ) при переходе от стандартных условий к деионизованной воде (Milli-Q). Для сравнения, нативные дуплексы при таком изменении буферных условий снижают термостабильность более чем на  $40^\circ\text{C}$ . Изменения в термостабильности ФГО-дуплексов имеют как энтальпийный, так и энтропийный вклады. Анализ показывает, что изменения энтальпии гибридизации несколько больше по амплитуде, чем энтропии, несмотря на то, что значимых изменений в структуре не происходит. Наблюдается общая тенденция незначительного изменения термостабильности комплексов ФГО с нуклеиновыми кислотами при увеличении числа модификаций в цепи в буферных условиях, близких к физиологическим.

Полученные результаты показывают перспективность использования частично и полностью модифицированных фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов в различных приложениях, в том числе в тех, где существует необходимость модулирования термостабильности комплексов без изменения заданной нуклеотидной последовательности.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ООО “Нооген” за синтез и предоставление фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, а также М.И. Мещаниновой за синтез и выделение олигорибонуклеотидов.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Анализ структуры и термодинамической стабильности комплексов фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов выполнен при поддержке Российского научного фонда (грант 18-14-00357).

Выделение олигонуклеотидов проводили по методикам, разработанным ранее в рамках базового бюджетного финансирования (проект А-0309-2016-0004).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

М.С. Купрюшкин и Д.В. Пышный являются соучредителями ООО “Нооген”, которое является правообладателем фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и способа их получения.

А.А. Ломзов и Е.С. Дюдеева заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chernikov I.V., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 444. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444>
2. Shen W., De Hoyos C.L., Migawa M.T., Vickers T.A., Sun H., Low A., Bell M. // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 640–650. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0106-2>
3. Benizri S., Gissot A., Martin A., Violet B., Grinstaff M.W., Barthélémy P. // Bioconjugate Chem. 2019. V. 30. P. 366–383. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00761>
4. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. // Acta Naturae. 2014. V. 6. P. 123–125.
5. Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. // Patent WO2016028187A1, 2016.
6. Kuznetsov N.A., Kupryushkin M.S., Abramova T.V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S. // Mol. BioSyst. 2016. V. 12. P. 67–75. <https://doi.org/10.1039/C5MB00692A>
7. Lebedeva N.A., Anarbaev R.O., Kupryushkin M.S., Rechkunova N.I., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A., Lavrik O.I. // Bioconjug. Chem. 2015. V. 26. P. 2046–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00451>
8. Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. // Biochimie. 2020. V. 168. P. 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>
9. Dmitrienko E., Naumova O., Fomin B., Kupryushkin M., Volkova A., Amirkhanov N., Semenov D., Pyshnaya I., Pyshnyi D. // Nanomedicine. 2016. V. 11. P. 2073–2082. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0071>
10. Epanchintseva A., Dolodoev A., Grigor'eva A., Chelobanov B., Pyshnyi D., Ryabchikova E., Pyshnaya I. // Nanotechnology. 2018. V. 29. P. 355 601. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aac933>
11. Markov A.V., Kupryushkin M.S., Goncharova E.P., Amirkhanov R.N., Vasilyeva S.V., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A., Logashenko E.B. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 774–782.
12. Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 709–718. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060153>

13. Lomzov A.A., Golyshev V.M., Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Pyshnyi V.P. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019. V. 37. P. 83–84. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1604468>
14. Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Schyolkina A.K., Poletaev A.I. // *Biopolymers*. 1973. V. 12. P. 89–110. <https://doi.org/10.1002/bip.1973.360120109>
15. Kypr J., Kejnovská I., Renčíuk D., Vorlíčková M. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 1713–1725. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp026>
16. Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Shernyukov A.V., Nekrasov M.D., Dovydenko I.S., Steisenko D.A., Pyshnyi D.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 513. P. 807–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.024>
17. Searle M.S., Williams D.H. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 2051–2056. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2051>
18. Vargas-Lara F., Starr F.W., Douglas J.F. // *Soft Matter*. 2017. V. 13. P. 8309–8330. <https://doi.org/10.1039/C7SM01220A>
19. Tataurov A.V., You Y., Owczarzy R. // *Biophys. Chem.* 2008. V. 133. P. 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.12.004>
20. Lokhov S.G., Pyshnyi D.V. // *FEBS Lett.* 1998. V. 420. P. 134–138. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01502-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01502-0)
21. Marky L.A., Breslauer K.J. // *Biopolymers*. 1987. V. 26. P. 1601–1620. <https://doi.org/10.1002/bip.360260911>
22. Schroeder S.J., Turner D.H. // *Methods Enzymol.* 2009. V. 468. P. 371–387. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)68017-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)68017-4)
23. Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // *Biophysics (Oxf.)*. 2012. V. 57. P. 19–34. <https://doi.org/10.1134/S0006350912010137>

## A Comparative Study of Hybridization of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides with DNA and RNA

A. A. Lomzov\*<sup>\*,#</sup>, M. S. Kupryushkin\*, E. S. Dyudeeva\*, and D. V. Pyshnyi\*<sup>\*,#</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (383) 363-51-35; e-mail: lozmov@niboch.nsc.ru, pyshnyi@niboch.nsc.ru

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

The structure and thermodynamic stability of RNA and DNA complexes with phosphoryl guanidine oligonucleotides containing modified phosphate groups, in which 1,3-dimethylimidazolidin-2-imine moiety introduced at the phosphorus atom, were studied. The substitution of negatively charged oxygen in the internucleoside phosphate by an electrically neutral tetraalkyl-substituted guanidine residue does not lead to a change in the conformation of the PGO/RNA duplex in comparison with the native DNA/RNA complex. The secondary structure is typical for the A-form of the double helix of hybrid complexes and differs from that of the RNA/RNA duplex. The introduction of modifications leads to a decrease in the thermal stability of the PGO/RNA complexes under standard conditions (1.01 M Na<sup>+</sup>, neutral pH values). The magnitude of destabilization weakly depends on the nucleotide sequence and, on average, decreases the thermal stability by 1.2°C per one modified residue. Duplexes of fully substituted PGO with DNA have thermal stability independent of the concentration of cations, and in the case of PGO/RNA, a notable decrease of melting temperature (~6°C) is observed when decrease ionic strength from standard conditions to deionized water (milliQ). In comparison, native duplexes, with the same changes in buffer conditions, reduce the thermal stability by more than 40 degrees. Changes in thermodynamic stability upon the oligodeoxyribonucleotide modifications are due to both changes in the values of hybridization enthalpy and entropy.

*Keywords:* nucleic acid analogs, modified oligonucleotides, phosphorylguanidine oligonucleotides, thermal stability, duplex



## НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНКазы Р КОНЪЮГАТЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ОЛИГО(*N*-МЕТИЛПИРРОЛОМ) КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

© 2021 г. Н. А. Данилин\*, \*\*, А. Л. Матвеев\*\*,  
Н. В. Тикунова\*\*, А. Г. Веньямина\*\*, Д. С. Новопашина\*, \*\*, #

\*Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

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

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 01.09.2020 г.

Принята к публикации 06.09.2020 г.

Впервые получены конъюгаты направляющих РНКазы Р олиго(2'-*O*-метилрибо)- и олигодезоксирибонуклеотидов (EGS-олигонуклеотидов) с олиго(*N*-метилпирролом). В модельной системе с использованием флуоресцентно-меченых химически синтезированных РНК-мишеней, соответствующих фрагментам мРНК генов *ftsZ* и *gyrA* *Acinetobacter baumannii*, продемонстрирована способность РНКазы Р расщеплять РНК в присутствии направляющих олигонуклеотидов и их конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом). Введение одного остатка олиго(*N*-метилпиррола) на 5'-конец направляющего EGS-олигодезоксирибонуклеотида значительно повышает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р, а его введение на 5'-конец направляющего EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) незначительно уменьшает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р. Показано, что присоединение олиго(*N*-метилпиррола) на 5'-конец олигонуклеотидов увеличивает эффективность их проникновения в клетки бактерий.

*Ключевые слова:* олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), РНКазы Р, EGS-олигонуклеотиды, олиго(*N*-метилпиррол)

DOI: 10.31857/S0132342321020081

### ВВЕДЕНИЕ

Создание принципиально новых антибактериальных препаратов является актуальной задачей современной биоорганической химии, молекулярной биологии и фундаментальной медицины. В настоящее время до конца не решенными остаются проблемы возникновения лекарственной устойчивости бактерий к антимикробным препаратам и побочных эффектов, возникающих при применении антибиотиков [1, 2]. Перспективным подходом к разработке антибактериальных препаратов является создание антисмысловых олигонуклеотидов, мишенью которых являются жизненно важные бактериальные РНК (см., например, [3]). Использование таких олигонуклео-

тидов позволяет блокировать экспрессию соответствующих бактериальных генов и приводить к подавлению роста бактерий.

Ранее было показано, что ключевой фермент созревания тРНК – РНКазы Р, природным субстратом которой является пре-тРНК, – способен гидролизовать РНК-мишень в составе комплекса с комплементарным ей антисмысловым олигонуклеотидом, содержащим ССА-последовательность на 3'-конце [4]. Эта способность РНКазы Р легла в основу EGS-технологии (external guide sequences technology), а соответствующие антисмысловые олигонуклеотиды, направляющие действие РНКазы Р, получили название EGS-олигонуклеотиды [5–7]. Было продемонстрировано, что использование EGS-олигонуклеотидов, направляющих бактериальную РНКазу Р на расщепление мРНК определенных бактериальных генов, позволяет подавить рост бактерий (см., например, [8–10]). В качестве основы для создания EGS-

Сокращения: EGS – внешние направляющие последовательности (external guide sequence); *Flu* – остаток флуоресцеина, *L1* – олиго(*N*-метилпиррол).

# Автор для связи (тел.: +7 (383) 363-51-29; факс: +7 (383) 363-51-53; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

олигонуклеотидов часто используют замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA – locked nucleic acid, BNA – bridged nucleic acid) [11, 12], морфолиновые олигонуклеотиды [9, 10, 13–16], олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) и фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды [17]. Одним из подходов к улучшению проникновения олигонуклеотидов в бактерии является их конъюгирование с молекулами-доставщиками (см., например, [18]). В качестве доставляющей группировки мы предлагаем использовать полиамид олиго(*N*-метилпиррол). Олиго(*N*-метилпирролы) являются аналогами пептидных антибиотиков нетропсина и дистамицина. Они положительно заряжены, сиквенс-специфически связываются с малой бороздкой ДНК и способны в отсутствие трансфектанта проникать в эукариотические клетки [19–22].

В данной работе предложено использование направляющих РНКазу Р конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и олигодезоксирибонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в качестве потенциальных антибактериальных препаратов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве бактериальной мишени нами выбран грамотрицательная бактерия *Acinetobacter baumannii*, вызывающая тяжелые внутрибольничные инфекции [23, 24], отличающаяся высокой устойчивостью к антибиотикам и включенная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в список наиболее опасных бактерий [25–27]. Мы предлагаем в качестве альтернативы классическим антибиотикам использовать EGS-олигонуклеотиды, способные ингибировать экспрессию жизненно важных генов этой бактерии. В качестве мишени для EGS-олигонуклеотидов были выбраны фрагменты мРНК генов домашнего хозяйства *ftsZ* и *gyrA* *A. baumannii* в области сайта инициации трансляции. Ген *ftsZ* кодирует нуклеотидсвязывающий белок *ftsZ*, играющий ключевую роль при делении прокариот [28]. ДНК-гираза, одна из субъединиц которой кодируется геном *gyrA*, является необходимым элементом процесса репликации бактерий [29]. Ингибирование экспрессии этих важных для жизнедеятельности бактерии генов должно вызывать нарушение жизненного цикла и подавление роста бактерий.

В качестве основы для EGS-олигонуклеотидов нами были выбраны олигодезоксирибонуклеотиды и аналоги олигорибонуклеотидов, содержащих в 2'-положении рибозы 2'-*O*-метильную группу. Олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) полностью устойчивы к действию ДНК- и РНК-специфических нуклеаз, обладают повышенной устойчивостью к действию нуклеаз двойного спектра и способны образовывать стабильные комплексы с РНК-мише-

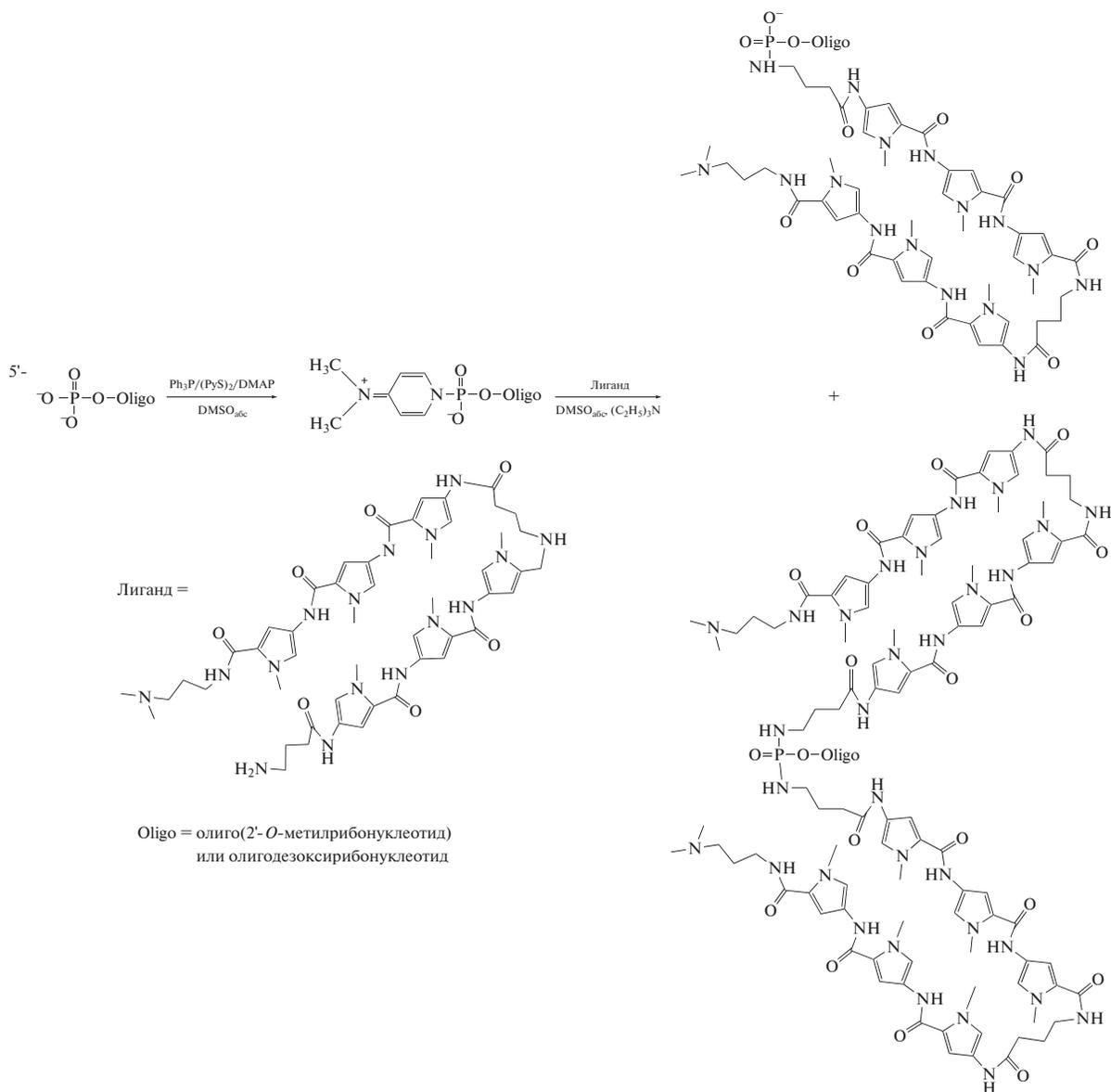
ню [30, 31]. Ранее было показано, что для эффективного взаимодействия РНКазы Р с комплексом РНК–EGS-олигонуклеотид необходимо наличие четырех немодифицированных рибонуклеотидов с 3'-конца EGS-олигонуклеотида [32–34].

Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) проводили, используя в качестве исходных 5'-фосфаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих четыре немодифицированных рибонуклеотида с 3'-конца, и 5'-фосфатов олигодезоксирибонуклеотидов. Присоединение лиганда проводили путем активации 5'-фосфата олигонуклеотида окислительно-восстановительной парой трифенилфосфин/дипиридилдисульфид ( $\text{PPh}_3/(\text{PyS})_2$ ) в присутствии диметиламинопиридина (DMAP) с последующим взаимодействием с аминопроизводным олиго(*N*-метилпиррола) по аналогии с работой Новашиной с соавт. [35] (схема 1).

Активацию 5'-фосфата проводили в диметилсульфоксиде, для чего олигонуклеотид предварительно переводили в цетавлоновую соль. Затем к активированному фосфату олигонуклеотида добавляли олиго(*N*-метилпиррол) и инкубировали при перемешивании при температуре 37°C (схема 1). Через 16 ч реакционную смесь, содержащую конъюгаты с одним и двумя остатками олиго(*N*-метилпиррола), осаждали. Конъюгаты выделяли путем электрофореза в денатурирующем препаративном ПААГ с последующей элюцией и обессоливанием и подтверждали строение методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии (табл. 1).

Аналогичным образом, используя в качестве исходных 5'-фосфаты 3'-флуоресцеинсодержащих олигонуклеотидов, получали конъюгаты 3'-флуоресцеин-меченых EGS-олигонуклеотидов с одним остатком олиго(*N*-метилпиррола) (табл. 1). Строение конъюгатов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. В результате реакции получали смесь моно- и бис-конъюгатов, с последующим выделением их в индивидуальном виде, выходы конъюгатов после выделения в расчете на первое нуклеотидное звено составили 1.1–7.1%. Подвижность конъюгатов при гель-электрофорезе была значительно ниже подвижности исходных олигонуклеотидов и зависела от количества присоединенных лигандов (рис. 1).

При исследовании способности РНКазы Р гидролизовать РНК-мишени в присутствии EGS-олигонуклеотидов и их конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) в качестве РНК-мишеней нами были использованы два модельных 5'-флуоресцеин-меченых олигорибонуклеотида, представляющие собой фрагменты мРНК генов *ftsZ* и *gyrA* *A. baumannii* (табл. 2) в районе сайта инициации трансляции.



**Схема 1.** Схема синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом). PPh<sub>3</sub> – трифенилфосфин, (PyS)<sub>2</sub> – дипиридилдисульфид, DMAP – диметиламинопиридин.

Расщепление РНК-мишеней проводили в присутствии 10-кратного избытка EGS-олигонуклеотидов или их конъюгатов при 37°C. На рис. 2 представлен пример электрофоретического разделения реакционных смесей, полученных в результате расщепления РНК-мишени r24-ftsZ РНКазой Р в присутствии конъюгата *L1-mf*.

При проведении расщепления РНК-мишеней РНКазой Р в присутствии конъюгатов EGS-олигонуклеотидов, содержащих два остатка олиго(*N*-метилпиррола), продуктов гидролиза не регистрировали, на электрофорезе наблюдали комплексы, обладающие меньшей подвижностью в сравнении с исходными РНК-мишенями (*данные не приведены*).

В результате сравнительного исследования способности РНКазы Р расщеплять модельные РНК-

мишени в составе их дуплексов с конъюгатами EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и EGS-олигодезоксирибонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) было обнаружено, что введение одного лиганда на 5'-конец направляющего EGS-олигодезоксирибонуклеотида значительно повышает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р, а введение одного лиганда на 5'-конец направляющего EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) незначительно уменьшает эффективность гидролиза РНК-мишени РНКазой Р (рис. 3). Такая разница, вероятно, связана с различиями в структурах дуплексов РНК-мишеней с олигодезоксирибонуклеотидами и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидами) и со способностью олиго(*N*-метилпиррола) взаимодействовать с малой бороздкой формирующей

**Таблица 1.** Синтезированные конъюгаты EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом)

| Шифр                           | Последовательность (5'-3')   | Выход*, % | Молекулярная масса |            |
|--------------------------------|--|-----------|--------------------|------------|
|                                |  |           | рассчитано         | получено** |
| ( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -mf | 5'-( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -pA <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> ACCA | 1.1       | 7973.09            | 7974.05    |
| <i>LI</i> -mf                  | 5'- <i>LI</i> -pA <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> ACCA                 | 2.4       | 6985.97            | 6983.83    |
| <i>LI</i> -mf- <i>Flu</i>      | 5'- <i>LI</i> -pA <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> ACCA- <i>Flu</i>     | 7.1       | 7475.44            | 7476.10    |
| ( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -mg | 5'-( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -pU <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> ACCA | 2.7       | 7862.96            | 7862.01    |
| <i>LI</i> -mg                  | 5'- <i>LI</i> -pU <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> ACCA                 | 4.5       | 6875.85            | 6874.11    |
| <i>LI</i> -mg- <i>Flu</i>      | 5'- <i>LI</i> -pU <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> ACCA- <i>Flu</i>     | 2.3       | 7033.16            | 7034.70    |
| ( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -df | 5'-( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -pATTCAAATGAGGCCACCA   | 6.8       | 7530.81            | 7526.00    |
| <i>LI</i> -df                  | 5'- <i>LI</i> -pATTCAAATGAGGCCACCA   | 6.3       | 6543.69            | 6547.15    |
| <i>LI</i> -df- <i>Flu</i>      | 5'- <i>LI</i> -pATTCAAATGAGGCCACCA- <i>Flu</i>   | 1.5       | 7033.16            | 7034.70    |
| ( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -dg | 5'-( <i>LI</i> ) <sub>2</sub> -pTTTCCGATACGCTCACCA   | 5.3       | 7448.73            | 7452.32    |
| <i>LI</i> -dg                  | 5'- <i>LI</i> -pTTTCCGATACGCTCACCA   | 2.1       | 6461.61            | 6461.99    |
| <i>LI</i> -dg- <i>Flu</i>      | 5'- <i>LI</i> -pTTTCCGATACGCTCACCA- <i>Flu</i>   | 2.7       | 6951.08            | 6952.12    |

\* Выход в расчете на первое нуклеозидное звено.

\*\* По результатам масс-спектрометрического анализа. Обозначения: *LI* – олиго(*N*-метилпиррол); m – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотид); d – олигодезоксирибонуклеотид; f – EGS-олигонуклеотид, направляющий РНКазу Р на мРНК гена *ftsZ*; g – EGS-олигонуклеотид, направляющий РНКазу Р на мРНК гена *gyrA*; *Flu* – остаток флуоресцеина; p – фосфат; N<sup>m</sup> – 2'-*O*-метилрибонуклеотид. Структуру конъюгатов см. на схеме 1.

**Таблица 2.** Последовательности 5'-флуоресцентно-меченых РНК-мишеней

| Шифр     | Последовательность (5'-3')                         | Выход*, % |
|----------|--|-----------|
| r24-ftsZ | 5'- <i>Flu</i> -AGGUC <u>AUG</u> GCCUCAUUUGAAUUUA  | 45.4      |
| r24-gyrA | 5'- <i>Flu</i> -UAUGCA <u>AUG</u> AGCGUAUCGGAUAUCC | 42.0      |

\* Выход в расчете на первое нуклеозидное звено.

Обозначения: *Flu* – остаток флуоресцеина; AUG – сайт инициации трансляции.

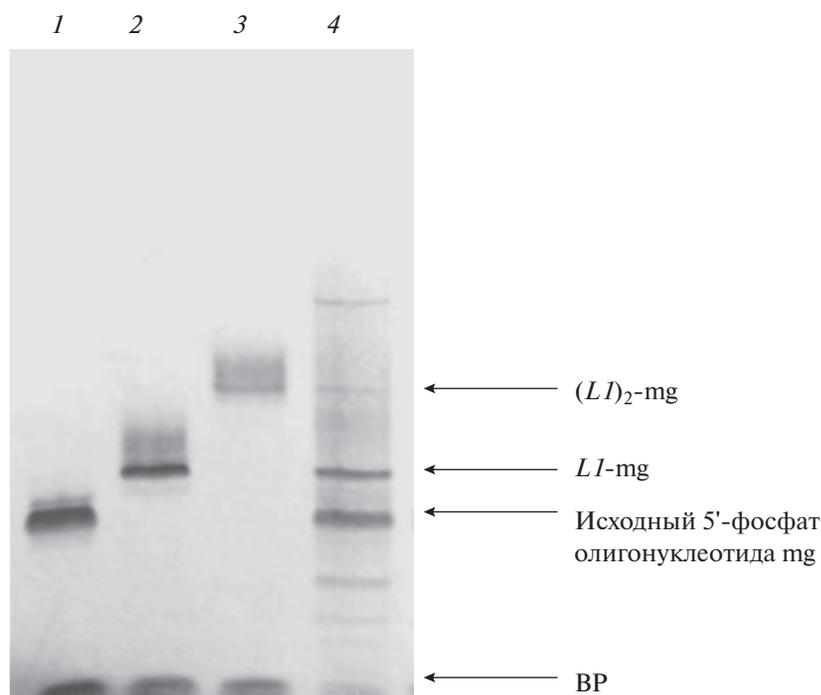
шейся двойной спирали. Для обоих типов EGS-олигонуклеотидов эффективность гидролиза РНК мишени r24-ftsZ была выше, чем эффективность гидролиза РНК-мишени r24-gyrA.

Несколько неожиданным для нас оказался результат, полученный на РНК-мишени r24-gyrA. Расщепление этой мишени в присутствии конъюгата EGS-олигодезоксирибонуклеотида с олиго(*N*-метилпирролом) РНКазой Р происходило более эффективно, чем для аналогичного конъюгата EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида) (рис. 4). Возможно, данный эффект связан со значительной термической стабилизацией комплекса EGS-олигодезоксирибонуклеотид–РНК-мишень за счет дополнительного взаимодействия введенного остатка олиго(*N*-метилпиррола) с дуплексом.

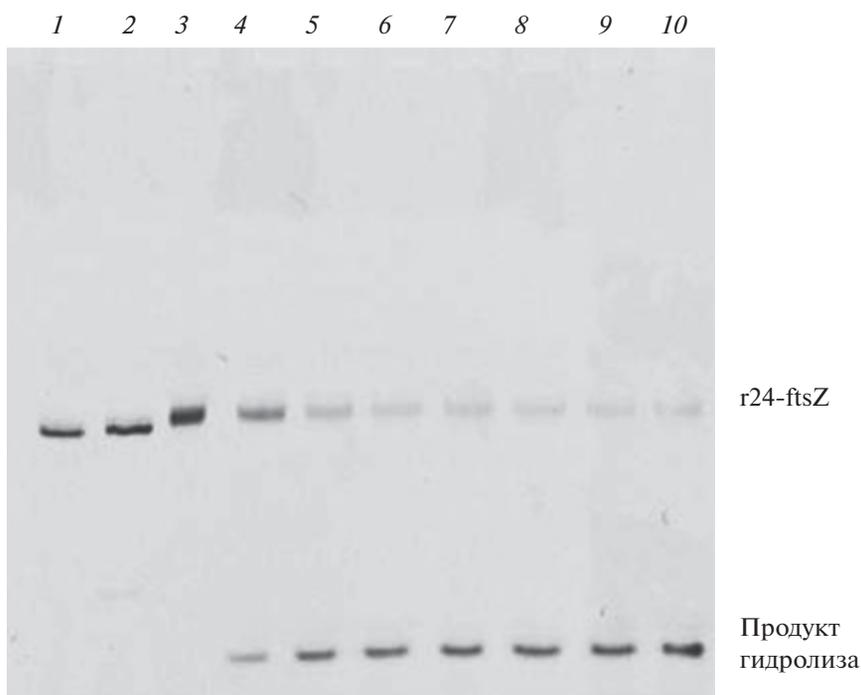
Полученные результаты демонстрируют возможность эффективного гидролиза РНК-мишени РНКазой Р в присутствии EGS-олигонуклеотидов и их конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) *in vitro*.

Для исследования проникновения конъюгатов EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в бактерии была использована специально полученная серия их 3'-флуоресцеин-меченых аналогов (табл. 1) и контрольные 3'-флуоресцеин-меченые EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (*mf-Flu* и *mg-Flu*) и EGS-олигодезоксирибонуклеотиды (*df-Flu* и *dg-Flu*). Сравнительное исследование проникновения конъюгатов EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в клетки бактерий *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii* методом проточной цитофлуорометрии показало, что введение олиго(*N*-метилпиррола) в большинстве случаев улучшает эффективность проникновения конъюгатов (рис. 5).

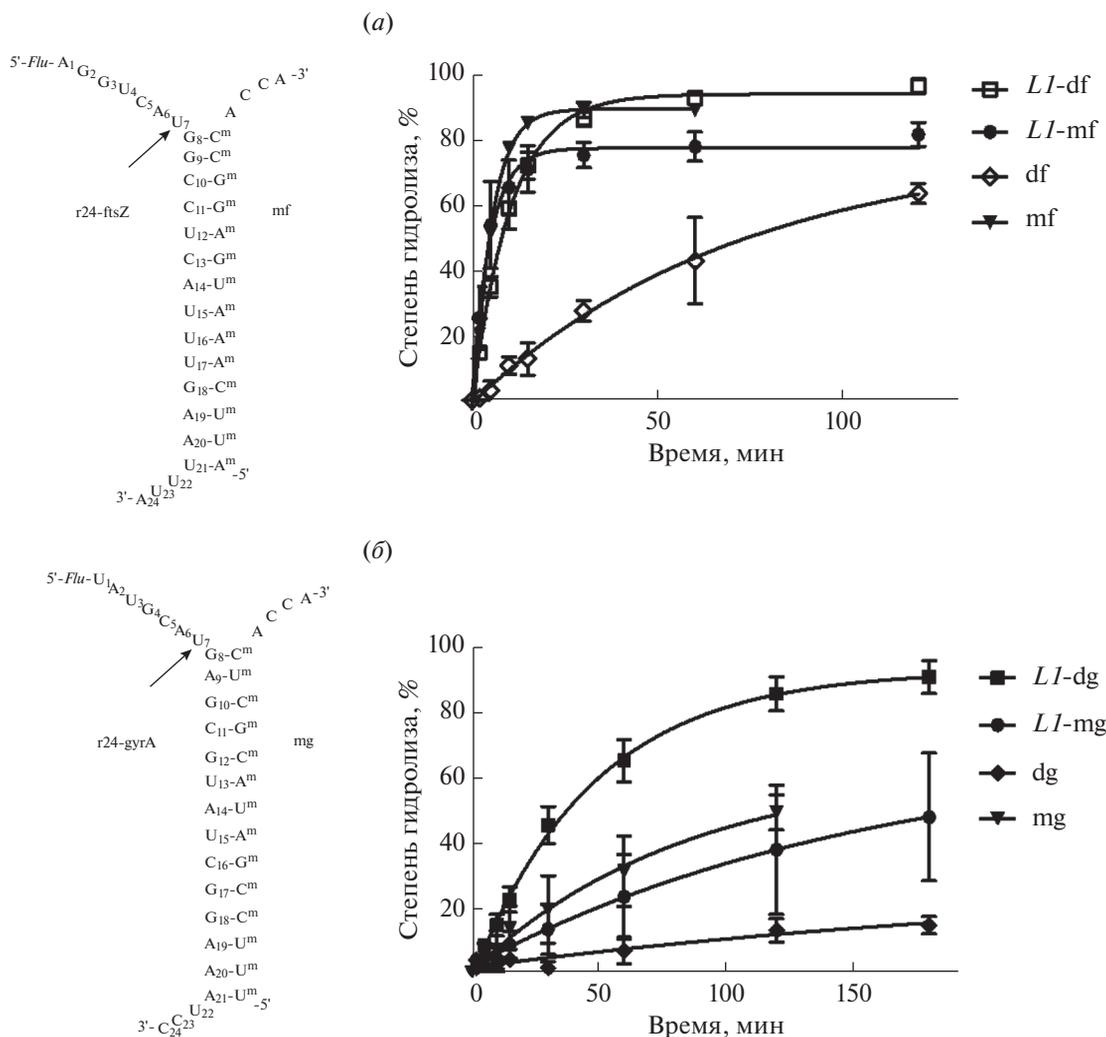
Полученные результаты подтверждают перспективность использования созданных в данной работе направляющих РНКазу Р конъюгатов EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и EGS-олигодезоксирибонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в качестве потенциальных антибактериальных препаратов.



**Рис. 1.** Электрофореграмма, полученная при анализе исходного олигонуклеотида 5'-p-U<sup>m</sup>U<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>C<sup>m</sup>G<sup>m</sup>A<sup>m</sup>U<sup>m</sup>A<sup>m</sup>C<sup>m</sup>-G<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>C<sup>m</sup>АССА (1), выделенных конъюгатов  $LI$ -mg, содержащего один остаток олиго(*N*-метилпиррола) (2), и  $(LI)_2$ -mg, содержащего два остатка олиго(*N*-метилпиррола) (3), и реакционной смеси при их получении (4). Структуру конъюгатов см. в табл. 1 и на схеме 1. Условия: денатурирующий 15%-ный ПААГ, окрашивание "Stains-all". ВР – бромфеноловый синий.



**Рис. 2.** Электрофореграмма, полученная при разделении продуктов гидролиза 5'-флуоресцеин-меченой РНК-мишени (r24-ftsZ) РНКазой Р в присутствии конъюгата EGS-олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотида)  $LI$ -mf: 1 – контроль без EGS-олигонуклеотида через 0 мин, 2 – контроль без EGS-олигонуклеотида через 60 мин, 3 – контроль без РНКазы Р, 4–10 – реакционная смесь через 2, 5, 10, 15, 30, 60 и 120 мин после начала реакции с ферментом. Условия: 200 нМ РНК М1, 2 мкМ белок С5, 2 мкМ РНК-мишень, 20 мкМ EGS-олигонуклеотид, 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 37°C.

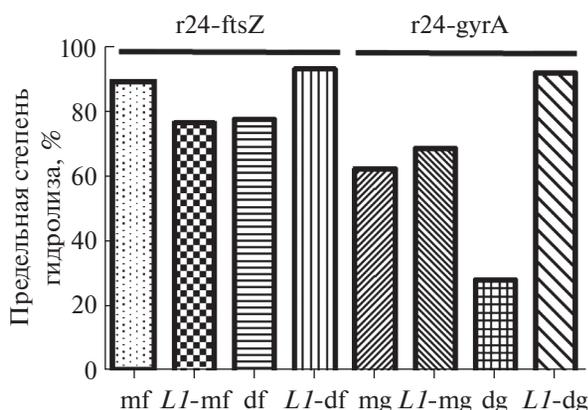


**Рис. 3.** Кривые расщепления 5'-флуоресцеин-меченых РНК-мишеней r24-ftsZ (а) и r24-gyrA (б) РНКазой Р в присутствии направляющих олигодезоксирибонуклеотидов (df и dg) и (2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (mf и mg), а также их 5'-конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) (*L1-df*, *L1-dg*, *L1-mf* и *L1-mg*). Условия: 200 нМ РНК М1, 2 мкМ белок С5, 2 мкМ флуоресцентно-меченая РНК-мишень, 20 мкМ EGS-олигонуклеотид, 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 37°C. Данные получены путем усреднения результатов как минимум трех экспериментов. За 100% принимали полное превращение РНК-мишени в продукты гидролиза. Стрелкой указан сайт расщепления РНК-мишени РНКазой Р.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы: перхлорат натрия, *N*-метилимидазол (Acros Organics, США); 5-этилтио-1*H*-тетразол (Biosset, Россия); СРG-полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном, фосфитамиды *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-метилрибонуклеотидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсилилрибонуклеозидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксирибонуклеотидов (ChemGenes, США); фосфитамида 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этанола, фосфитамида 1-диметокситритилокси-2-(*N*-

тиомочевина-(ди-*O*-пivaloил-флуоресцеин)-4-аминобутил)-пропанола, модифицированный СРG-полимерный носитель с флуоресцеином (Glen Research, США); краситель "Stains-all", персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, 2,6-лутидин, трифенилфосфин, 4-(*N,N*-диметил)аминопиридин, 2,2'-дипиридилдисульфид, цетилтриметиламмоний бромид, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (Fluka, Швейцария); мочевины, 40%-ный водный раствор метиламина (Merck, Германия); молекулярные сита Тrap-RacTM Molecular Sieve Bag 3 Å (Millipore, США); пиридин, ацетон, тетрагидрофуран, ацетонитрил (Panreac, Испания); ксиленцианол FF, бромфеноловый синий (Serva, Германия); Na<sub>2</sub>EDTA



**Рис. 4.** Предельная степень гидролиза модельных РНК-мишеней r24-ftsZ и r24-gyrA в присутствии соответствующих EGS-олигодезоксирибонуклеотидов (df и dg), EGS-олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов) (mf и mg), а также их 5'-конъюгатов с олиго(*N*-метилпирролом) (L1-df, L1-dg, L1-mf и L1-mg). Предельная степень гидролиза рассчитывали по уравнению (1) (см. "Эксперим. часть"), принимая за 100% полное превращение РНК-мишени в продукты гидролиза.

(Amresco, США); акриламид, *N,N'*-метиленисакриламид, пропионовый ангидрид (Acros Organics, Бельгия); трис(гидроксиметил)аминометан, триэтиламин, триэтиламинтригидрофторид, этокситриметилсилан, хлорид магния (Sigma-Aldrich, США); хлористый метилен, йод кристаллический (Криохром, Россия), а также другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства.

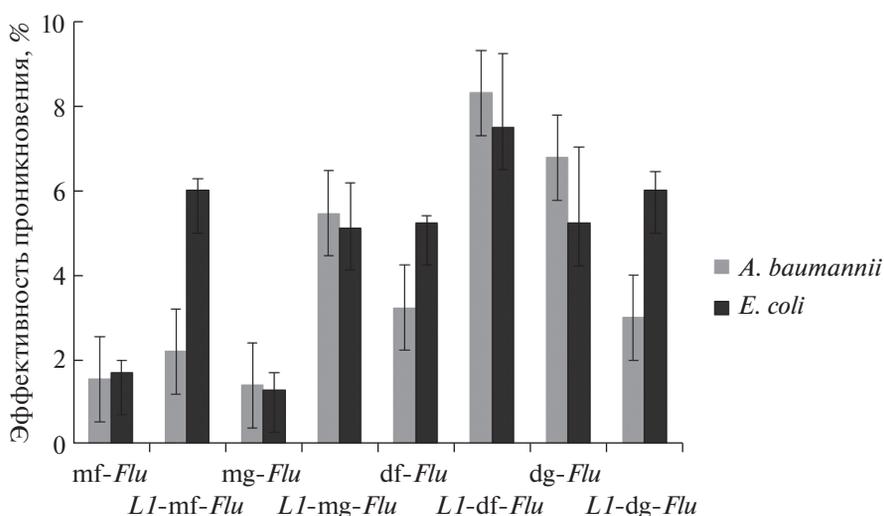
Олиго(*N*-метилпиррол) был получен с.н.с. В.А. Рябининым и в.н.с. А.Н. Синяковым, лаборатория биоорганической химии ферментов Ин-

ститута химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН [35].

Для ферментативных реакций использовали РНКазу Р *E. coli* (К.Ф. 3.1.26.5), компоненты которой получены в лаборатории биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН: каталитически активная РНК М1 синтезирована по методике, описанной в работе Guerrier-Takada et al. [36], и любезно предоставлена д.х.н. Н.А. Моор, а белковый кофактор С5 получен по протоколу, приведенному в работе Guerrier-Takada et al. [37], и любезно предоставлен д.б.н. С.Н. Ходыревой.

В работе использовали следующие приборы: спектрофотометр Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), термостатируемый шейкер Thermomixer F1.5 (Eppendorf, Германия), центрифуги MiniSpin plus и Centrifuge 5415R (Eppendorf, Германия), Speed-Vac Concentrator SVC-100H (Savant, США), термостатируемый шейкер (Bioer, США), камеру для вертикального электрофореза (Хеликон, Россия), прибор для сушки гелей Gel Dryer B35 (Bio-Rad, США).

Олигодезоксирибонуклеотиды, олигорибонуклеотиды и их модифицированные аналоги были синтезированы с использованием соответствующих мономерных синтонов и полимерных носителей твердофазным фосфитамидным методом на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе АСМ-800 (Биосет, Россия) по оптимизированным для данного прибора протоколам в лаборатории химии РНК Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Деблокирование олигонуклеотидов проводили в стандартных условиях. Выделение олигорибонуклеотидов и их мо-



**Рис. 5.** Эффективность проникновения (%) 5'-конъюгатов направляющих олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом), содержащих остаток флуоресцеина на 3'-конце, в *A. baumannii* и *E. coli* по данным проточной цитофлуориметрии.

дифицированных аналогов проводили методом препаративного гель-электрофореза.

Все водные растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (с удельным сопротивлением  $18 \times 10^6$  Ом/см), полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США).

Олигонуклеотиды, их конъюгаты и производные осаждали из водных растворов в виде натриевых солей десятикратным объемом 2%-ного раствора  $\text{NaClO}_4$  в ацетоне. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали ацетоном и высушивали на воздухе.

**Расчет коэффициентов молярного поглощения.** Значения молярных коэффициентов поглощения для 2'-*O*-метилрибонуклеотидов при 260 нм принимали равными соответствующим молярным коэффициентам поглощения для рибонуклеотидов. Молярные коэффициенты поглощения флуоресцентно-меченых производных олигонуклеотидов считали равными сумме значений молярных коэффициентов поглощения олигонуклеотидов и молярного коэффициента поглощения флуоресцеина, присоединенного к олигомеру ( $20900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 260 нм). Молярный коэффициент олиго(*N*-метилпиррола) —  $36610 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 260 нм [35]. Молярные коэффициенты были рассчитаны с учетом гипохромного эффекта в программном пакете OligoAnalyzer 3.1.

**Аналитический гель-электрофорез в денатурирующих условиях.** Анализ гомогенности олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов проводили методом гель-электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид : *N,N'*-метиленбисакриламид (30 : 0.5), 8 М мочевины, 50 мМ Трис- $\text{H}_3\text{BO}_3$ , pH 8.3, 0.1 мМ  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) при напряжении 50 В/см и толщине геля 0.4 мм. К олигонуклеотидным образцам (~0.05 о.е.) для нанесения на гель добавляли 4–5 мкл раствора 8 М мочевины, содержавшего 0.05% ксиленианолового голубого и 0.05% бромфенолового синего. Для визуализации олигонуклеотидов и их производных использовали раствор, приготовленный из 50 мг красителя “Stains-all” и 100 мл смеси формамид : вода (1 : 1). После прокрашивания гели высушивали в течение 40–70 мин на приборе GelDryer 583 (Bio-Rad, США).

**Выделение олигонуклеотидов и их конъюгатов препаративным гель-электрофорезом.** Деблокированные олигонуклеотиды, их конъюгаты и производные выделяли с помощью препаративного электрофореза в 15%-ном ПААГ в указанных выше условиях, при толщине геля 0.4 мм. После электрофореза гель визуализировали в УФ-свете с использованием пластин DC-Alufohlen Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, а в случае флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов ориентировались на соответствующую окрашенную полосу. Участки геля, содержащие про-

дукт, вырезали и проводили элюцию нуклеотидного материала из ПААГ 0.3 М водным раствором  $\text{NaClO}_4$  в течение 16 ч при 25°C. Обессоливание олигонуклеотидов проводили на фазе C18 (Waters, США).

Строение полученных олигонуклеотидов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра REFLEX III (Bruker Daltonics, Германия; Центр коллективного пользования Центра масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

**Синтез конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих остатки олиго(*N*-метилпиррола) на 5'-конце.** 5'-Фосфат олигонуклеотида в количестве 20 ОЕ<sub>260</sub> осаждали в виде цетилтриметиламмониевой соли, добавляя 8%-ный водный раствор бромид цетилтриметиламмония порциями 10, 5, 3 и далее по 1 мкл до прекращения выделения осадка. Осадок олигонуклеотида сушили в течение часа в вакууме в эксикаторе с  $\text{P}_2\text{O}_5$ . К осадку добавляли 5 мг (41 мкмоль) DMAP в 50 мкл  $\text{DMSO}_{\text{abc}}$ , 5.3 мг  $(\text{PyS})_2$  (25 мкмоль) в 25 мкл  $\text{DMSO}_{\text{abc}}$  и 6.8 мг  $\text{Ph}_3\text{P}$  (25 мкмоль) в 25 мкл  $\text{DMSO}_{\text{abc}}$  и перемешивали в течение 15 мин при температуре 37°C. Затем добавляли раствор 1 мг (1 мкмоль) олиго(*N*-метилпиррола) в 105 мкл смеси TEA :  $\text{DMSO}_{\text{abc}}$  (1 : 20). Реакцию проводили при перемешивании при температуре 37°C в течение 16 ч. Реакционную смесь осаждали в виде натриевой соли.

**Приготовление раствора холофермента РНКазы Р.** Раствор РНК М1 инкубировали в течение 5 мин при 65°C, затем медленно охлаждали до комнатной температуры в течение 30 мин. После этого готовили свежий раствор белка С5 в буфере, содержавшем 10 мМ Трис- $\text{HCl}$  (pH 7.5), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , смешивали растворы РНК М1 и белка С5 и инкубировали их в течение 5 мин при 37°C. Использовали 10-кратный избыток белка С5 по отношению к РНК М1, концентрацию холофермента принимали равной концентрации РНК М1. Полученный раствор холофермента РНКазы Р сразу же использовали для проведения требуемых реакций.

**Расщепление флуоресцентно-меченых модельных РНК-мишеней РНКазой Р в присутствии направляющих олигонуклеотидов.** Реакцию проводили в 20 мкл раствора, содержавшего 10 мМ Трис- $\text{HCl}$  (pH 7.5), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.2 мкМ РНК М1, 2 мкМ белок С5. Контрольный раствор содержал все компоненты, кроме РНК М1 и белка С5. Готовили 10 мкл раствора РНК-субстрата, содержавшего 20 мкМ флуоресцентно-меченую РНК-мишень и 200 мкМ направляющий олигонуклеотид. Предварительно для разрушения устойчивых вторичных структур, образо-

вавшихся при хранении РНК, и образования комплекса РНК-мишени с направляющим олигонуклеотидом раствор РНК-субстрата инкубировали 2 мин при 90°C, затем охлаждали 5 мин при 25°C. Для начала реакции добавляли к приготовленной реакционной смеси холофермента РНКазы Р раствор субстрата. Через 0, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 и 180 мин отбирали из реакционной смеси пробы объемом 2 мкл и смешивали их с 4 мкл денатурирующего буфера для нанесения (по 0.05% ксиленианолювого голубого и бромфенолового синего в 8 М мочеvine). Продукты реакции анализировали электрофорезом в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Гель сканировали с использованием системы визуализации гелей Quantum St5 (Vilber Lourmat, Франция) и полученное изображение обрабатывали в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

**Расчет кинетических параметров расщепления РНК-субстрата РНКазой Р.** Данные, полученные по результатам расщепления РНК-субстрата РНКазой Р, обрабатывали в программе Microsoft Excel. Долю продукта реакции рассчитывали как отношение интенсивности полосы, соответствующей продукту реакции, к суммарной интенсивности полос, соответствующих РНК-субстрату и продукту реакции. Расчет проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prizm 7.00.159 по уравнению для реакции псевдопервого порядка:

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

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

**Исследование проникновения 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в бактериальные клетки.** Исследование проникновения 3'-флуоресцентно-меченых конъюгатов EGS-олигонуклеотидов с олиго(*N*-метилпирролом) в клетки проводили на культурах *E. coli* и *A. baumannii*. Ночную культуру бактериальных клеток разводили в 100 раз ростовой средой LB (лизогенный бульон, среда Лурия–Бертани) и инкубировали клетки ( $3-5 \times 10^6$  кл./мл) в течение 2 ч при 37°C до достижения  $OD_{600}$  0.35. Культуру клеток готовили в экспоненциальной фазе роста ( $5-6 \times 10^6$  кл./мл), клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 4 мин и ресуспендировали в среде LB, содержащей конъюгат. Конечные концентрации конъюгатов в среде составляли 0.2 или 1 мкМ. Клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C при качании в темноте. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 4 мин и добавляли 100 мкл 0.9%-ного раствора NaCl. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл 4%-ного раствора формальдегида в фос-

фатном буфере и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре при качании. Затем клетки трижды промывали стерильным фосфатным буфером и инкубировали с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) в течение дополнительных 15 мин. Проточную цитометрию проводили с использованием прибора NovoCyte (ACEA Biosciences, США).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Сиднею Альтману (Sidney Altman) за инициацию исследований в области EGS-технологий в нашем институте, доктору Донне Весоловски (Donna Wesolowski) за любезно предоставленные плазмиды для получения компонентов холофермента РНКазы Р, к.х.н. В.А. Рябинину и к.х.н. А.Н. Синякову за синтез и выделение олиго(*N*-метилпиррола), к.х.н. А.А. Черносову за регистрацию масс-спектров, а также д.б.н. С.Н. Ходыревой и д.х.н. Н.А. Моор за наработку и выделение белка C5 и РНК M1 соответственно.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта базового бюджетного финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210021-7.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Llor C., Bjerrum L. // Ther. Adv. Drug Saf. 2014. V. 5. P. 229–241. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
2. Guidry C.A., Mansfield S.A., Cook C.H., Sawyer R.G. // Surg. Clin. North Am. 2014. V. 94. P. 1195–1218. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2014.08.010>
3. Bai H., Xue X., Hou Z., Zhou Y., Meng J., Luo X. // Curr. Drug Discov. Technol. 2010. V. 7. P. 76–85. <https://doi.org/10.2174/157016310793180594>
4. Walker S.C., Engelke D.R. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 41. P. 77–102. <https://doi.org/10.1080/10409230600602634>
5. Förster A.C., Altman S. // Science. 1990. V. 249. P. 783–786. <https://doi.org/10.1126/science.1697102>

6. *Davies-Sala C., Soler-Bistué A., Bonomo R.A., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015. V. 1354. P. 98–110.  
<https://doi.org/10.1111/nyas.12755>
7. *Derksen M., Mertens V., Pruijn G.J.* // *Biomolecules.* 2015. V. 5. P. 3029–3050.  
<https://doi.org/10.3390/biom5043029>
8. *Lundblad E.W., Altman S.* // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 27. P. 212–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.03.003>
9. *Wesolowski D., Tae H.S., Gandotra N., Llopis P., Shen N., Altman S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 16582–16587.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1112561108>
10. *Wesolowski D., Alonso D., Altman S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 8686–8689.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1306911110>
11. *Soler Bistué A.J.C., Martín F.A., Vozza N., Ha H., Joaquin J.C., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 13230–13235.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906529106>
12. *Jackson A., Jani S., Sala C.D., Soler-Bistué A.J., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Biol. Methods Protoc.* 2016. V. 1. P. bpw001.  
<https://doi.org/10.1093/biomethods/bpw001>
13. *Shen N., Ko J., Xiao G., Wesolowski D., Shan G., Geller B., Izadjoo M., Altman S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 8163–8168.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903491106>
14. *Augagneur Y., Wesolowski D., Tae H.S., Altman S., Ben Mamoun C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 6235–6240.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1203516109>
15. *Sala C.D., Soler-Bistué A.J.C., Korrapun L., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e47690.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047690>
16. *Sawyer A.J., Wesolowski D., Gandotra N., Stojadinovic A., Izadjoo M., Altman S., Kyriakides T.R.* // *Int. J. Pharm.* 2013. V. 453. P. 651–655.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.041>
17. *Danilin N.A., Koroleva L.S., Novopashina D.S., Venyaminova A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 825–832.  
<https://doi.org/10.1134/S106816201906013X>
18. *Jani S., Jackson A., Davies-Sala C., Chiem K., Soler-Bistué A., Zorreguieta A., Tolmasky M.E.* // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1737. P. 89–98.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7634-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7634-8_6)
19. *Ahmad A., Ranjan S., Zhang W., Zou J., Pyykkö I., Kinnunen P.K.J.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1848. P. 544–553.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.008>
20. *Kawamoto Y., Bando T., Sugiyama H.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. P. 1393–1411.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.026>
21. *Lin J., Nagase H.* // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 544.  
<https://doi.org/10.3390/biom10040544>
22. *Dervan P.B., Doss R.M., Marques M.A.* // *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents.* 2005. V. 5. P. 373–387.  
<https://doi.org/10.2174/1568011054222346>
23. *Wong D., Nielsen T.B., Bonomo R.A., Pantapalangkoor P., Luna B., Spellberg B.* // *Clin. Microbiol. Rev.* 2017. V. 30. P. 409–447.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>
24. *Harding C.M., Hennon S.W., Feldman M.F.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2018. V. 16. P. 91–102.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
25. *Doi Y., Bonomo R.A., Hooper D.C., Kaye K.S., Johnson J.R., Clancy C.J., Thaden J.T., Stryjewski M.E., van Duin D.* // *Clin. Infect. Dis.* 2017. V. 64 (Suppl. 1). P. S30–S35.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw829>
26. *Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outterson K., Patel J., Cavalieri M., Mcox E., Rhouchens C.R., Grayson L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N., and the WHO Pathogens Priority List Working Group Aboderin A.O., Al-Abri S.S., Jalil N.A., Benzonana N., Bhattacharya S., Brink A.J., Burkert F.R., Cars O., Cornaglia G., Dyar O.J., Wfriedrich A.W., Gales A.C., Gandra S., Giske C.G., Goff D.A., Goossens H., Gottlieb T., Blanco M.G., Hryniewicz W., Kattula D., Jinks T., Skanj S.S., Kerr L., Kieny M.-P., Kim Y.S., Kozlov R.S., Labarca J., Laxminarayan R., Leder K., Leibovici L., Levy-Hara G., Littman J., Malhotra-Kumar S., Manchanda V., Moja L., Ndoye B., Pan A., Paterson D.L., Paul M., Qiu H., Ramon-Pardo P., Rodriguez-Baño J., Sanguinetti M., Sengupta S., Sharland M., Si-Mehand M., Lsilver L.L., Song W., Steinbakk M., Thomsen J., Thwaites G.E., van der Meer J.W.M., Kinh N.V., Vega S., Villegas M.V., Wechsler-Fördös A., Wertheim H.F.L., Wesangula E., Woodford N., Oyilmaz F.O., Zorzet A.* // *Lancet. Infect. Dis.* 2018. V. 18. P. 318–327.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
27. *Tacconelli E., Magrini N.* // *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.* Geneva: World Health Organization, 2018.
28. *Вишняков И.Е., Борхсениус С.Н.* // *Цитология.* 2007. Т. 49. С. 421–429. [*Vishnyakov I.E., Borchsenius S.N.* // *Cell Tissue Biol.* 2007. V. 1. P. 206–214.]  
<https://doi.org/10.1134/S1990519X07030029>
29. *Сидоренко С.В., Тишков В.И.* // *Усп. биол. химии.* 2004. Т. 44. С. 263–306.
30. *Cummins L.L., Owens S.R., Risen L.M., Lesnik E.A., Freier S.M., McGee D., Guinasso C.J., Cook P.D.* // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 2019–2024.  
<https://doi.org/10.1093/nar/23.11.2019>
31. *Boutorine A.S., Venyaminova A.G., Repkova M.N., Sergeyeva Z.A., Pyshnyi D.V.* // *Biochimie.* 1994. V. 76. P. 23–32.  
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90059-0)
32. *Новопашина Д.С., Назаров А.С., Воробьева М.А., Купрюшкин М.С., Давыдова А.С., Ломзов А.А., Пышный Д.В., Альтман С., Веньяминова А.Г.* // *Мол. биология.* 2018. Т. 52. С. 1045–1054. [*Novopashina D.S., Nazarov A.S., Vorobjeva M.A., Kuprushkin M.S., Davydova A.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Altman S., Venyaminova A.G.* // *Mol. Biol.* 2018. V. 52. P. 905–912.]  
<https://doi.org/10.1134/S0026893318060134>

33. Jiang X., Sunkara N., Lu S., Liu F. // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1103. P. 45–56.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-730-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-730-3_4)
34. Perreault J.P., Altman S. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. P. 399–409.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90955-j](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90955-j)
35. Новопашина Д.С., Сняжков А.Н., Рябинин В.А., Перруо Л., Жиованнанжели К., Веняминова А.Г., Буторин А.С. // *Биоорг. химия.* 2013. Т. 39. С. 159–174. [*Novopashina D.S., Sinyakov A.N., Ryabinin V.A., Perrouault L., Giovannangeli C., Venyaminova A.G., Boutorine A.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. P. 138–152.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162013010081>
36. Guerrier-Takada C., Lumelsky N., Altman S. // *Science.* 1989. V. 246. P. 1578–1584.  
<https://doi.org/10.1126/science.2480641>
37. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. // *Cell.* 1983. V. 35. P. 849–857.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90117-4)

## Conjugates of Guiding RNase P Oligonucleotides with Oligo(*N*-Methylpyrrole) as Prospective Antibacterial Agents

N. A. Danilin\*, \*\*, A. L. Matveev\*\*, N. V. Tikunova\*\*,  
A. G. Venyaminova\*\*, and D. S. Novopashina\*, \*\*, #

#Phone: +7 (383) 363-51-29; fax: +7 (383) 363-51-53; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

\*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

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

The conjugates of guiding RNase P oligo(2'-*O*-methylribonucleotides) and oligodeoxyribonucleotides (EGS-oligonucleotides) with oligo(*N*-methylpyrrole) were synthesized for the first time. The ability of RNase P to hydrolyze RNA in the presence of EGS-oligonucleotides and their conjugates with oligo(*N*-methylpyrrole) was demonstrated in model systems using fluorescein labelled chemically synthesized oligoribonucleotides corresponded to the fragments of mRNA of *ftsZ* and *gyrA* genes of *Acinetobacter baumannii*. It has been shown that hydrolysis of RNA by RNase P occurs more effective in the presence of the conjugates than in the case of non-modified oligodeoxyribonucleotides. Introduction of oligo(*N*-methylpyrrole) in EGS-oligo(2'-*O*-methylribonucleotides) does not change significantly the effectiveness of hydrolysis. The enhancement of penetration ability as the result of oligo(*N*-methylpyrrole) attachment to 5'-terminus was demonstrated.

*Keywords:* oligo(2'-*O*-methylribonucleotides), bacterial RNase P, EGS-oligonucleotides, oligo(*N*-methylpyrrole)



## ДЕТЕКЦИЯ МАЛЫХ пРНК – ПРОДУКТОВ ТРАНСКРИПЦИИ 6S РНК – С ПОМОЩЬЮ НОЗЕРН-БЛОТ-ГИБРИДИЗАЦИИ В “ЗЕРКАЛЬНОМ” ВАРИАНТЕ

© 2021 г. О. Ю. Буренина\*, \*\*, #, Т. С. Орецкая\*\*, Е. А. Кубарева\*\*

\*Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205 Москва, ул. Нобеля, 3

\*\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята к публикации 13.10.2020 г.

Изучение РНК длиной менее 30 нуклеотидных остатков, в частности микроРНК и других экстремально коротких некодирующих РНК, часто сопряжено с трудностями их детекции не только в условиях *in vivo*, но и *in vitro*. Одной из таких молекул является бактериальная пРНК (от англ. рRNA, “product RNA”), синтезируемая РНК-полимеразой на матрице 6S РНК. Классическим способом идентификации пРНК является нозерн-блот-гибридизация (нозерн-блоттинг) с комплементарными зондами ДНК, содержащими различные метки и модифицированные нуклеозиды. Однако данный способ непригоден для поиска новых пРНК, последовательности которых неизвестны, а также является довольно дорогостоящим и затратным по времени. Мы предложили новый простой метод детекции синтеза пРНК на матрице 6S РНК, так называемый “зеркальный” точечный нозерн-блоттинг. Он не требует проведения гель-электрофореза, а зондом является сама пРНК, образующаяся в процессе транскрипции и содержащая остатки дигоксигенина (DIG). Данный метод позволит осуществлять быстрый скрининг новых 6S РНК или их мутантных вариантов на предмет их способности выступать в качестве матрицы для синтеза пРНК, а также оценивать эффективность данного процесса.

*Ключевые слова:* 6S РНК, пРНК, нозерн-блоттинг, дигоксигенин

DOI: 10.31857/S0132342321020068

### ВВЕДЕНИЕ

6S РНК – обширный класс бактериальных некодирующих РНК (нкРНК) длиной ~200 нт. Несмотря на отсутствие гомологии, все 6S РНК обладают строго консервативной вторичной структурой, идеально повторяющей конформацию промотора ДНК в открытом комплексе с РНК-полимеразой (РНКП) [1]. Благодаря этой особенности 6S РНК может блокировать активный центр фермента, что в масштабе клетки приводит к приостановке процесса транскрипции и, как следствие, экономии ресурсов в неблагоприятных условиях [2]. Интересно, что для “отмены” ингибирования транскрипции существует специальный механизм: РНКП способна синтезировать

короткие транскрипты (пРНК) непосредственно на матрице 6S РНК, что приводит к конформационным изменениям фермент-субстратного комплекса и высвобождению из него РНКП [3]. Этот процесс является своеобразным исключением из правила, поскольку в данном случае ДНК-зависимая РНКП использует для транскрипции РНК-субстрат. На сегодняшний день среди прокариотических нкРНК только 6S РНК обладает такой уникальной особенностью. Таким образом, синтез пРНК является одним из главных критериев, проверяемых при изучении новых молекул – предполагаемых аналогов 6S РНК из различных бактерий [4].

Иногда пРНК могут быть обнаружены при тщательном анализе транскриптомных данных (RNA-Seq) [5], что тем не менее требует последующей экспериментальной проверки. “Классическим” методом детекции РНК является нозерн-блот-гибридизация (нозерн-блоттинг) с комплементарными зондами. Крайне малая длина пРНК (14–30 нт) обуславливает необходимость использования спе-

Сокращения: DIG – дигоксигенин; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; NTP – нуклеозидтрифосфат; нкРНК – некодирующая РНК; пРНК – рRNA, “product RNA”, продукт транскрипции с матрицы 6S РНК; РНКП – РНК-полимераза.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-54-11; факс: +7 (495) 939-0338; эл. почта: alunit@inbox.ru).

циальных протоколов и модифицированных олигонуклеотидных зондов для повышения чувствительности метода, что, тем не менее, далеко не всегда приводит к положительным результатам. На данный момент всего в трех бактериях удалось обнаружить пРНК в условиях *in vivo* с помощью нозерн-блоттинга: *Escherichia coli* [6], *Bacillus subtilis* [7, 8] и *Rhodobacter sphaeroides* [9]. При этом в клетках *E. coli* и *R. sphaeroides* количество пРНК было достаточным для детекции с помощью  $^{32}\text{P}$ -меченных ДНК-зондов, тогда как для *B. subtilis* был разработан специальный протокол с использованием модифицированных ДНК-зондов, содержащих остатки ковалентно-замкнутых нуклеозидов (LNA) и остаток дигоксигенина (DIG). Было показано, что такой способ является гораздо более чувствительным по сравнению с классическим радиоактивным [10]. Тем не менее детектировать 6S-2 пРНК *B. subtilis* (факт синтеза которой в условиях *in vivo* долгое время оставался предметом научных споров) удалось только с помощью еще более усложненного протокола, используя РНК/LNA-зонды с экстремальным количеством модифицированных нуклеозидов и двумя метками DIG на 5'- и 3'-концах молекулы [8].

Детекция пРНК также осложняется особенностями их синтеза, который происходит лишь в определенных, заранее не известных условиях клеточного роста. Например, для *E. coli* активный синтез пРНК был зафиксирован только при резкой смене условий культивирования, когда к клеткам, выращенным на минимальной среде M9, добавляли 10-кратный избыток питательной среды LB, тем самым моделируя “выход” из неблагоприятных условий роста и “снятие” 6S РНК-опосредованного ингибирования транскрипции. При этом максимальная транскрипция пРНК наблюдалась лишь в течение первых 4 мин после смены культуральной среды [6]. Активный синтез 6S-1 пРНК *B. subtilis* также удалось детектировать только в условиях резкого “выхода” из стационарной фазы и только в течение первых 2 мин [7]. В то же время данный протокол не приводил к изменениям в синтезе 6S-2 пРНК *B. subtilis*, и соответствующие транскрипты были обнаружены только в экспоненциальной фазе роста клеток [8]. Уникальная ситуация наблюдалась у бактерии *R. sphaeroides*, в которой удалось детектировать пРНК во всех фазах клеточного роста с весьма незначительной активацией их синтеза в ответ на смену питательной среды, тогда как максимальное количество данных транскриптов приходилось на раннюю экспоненциальную фазу [8]. Однако данный феномен является скорее исключением из правила.

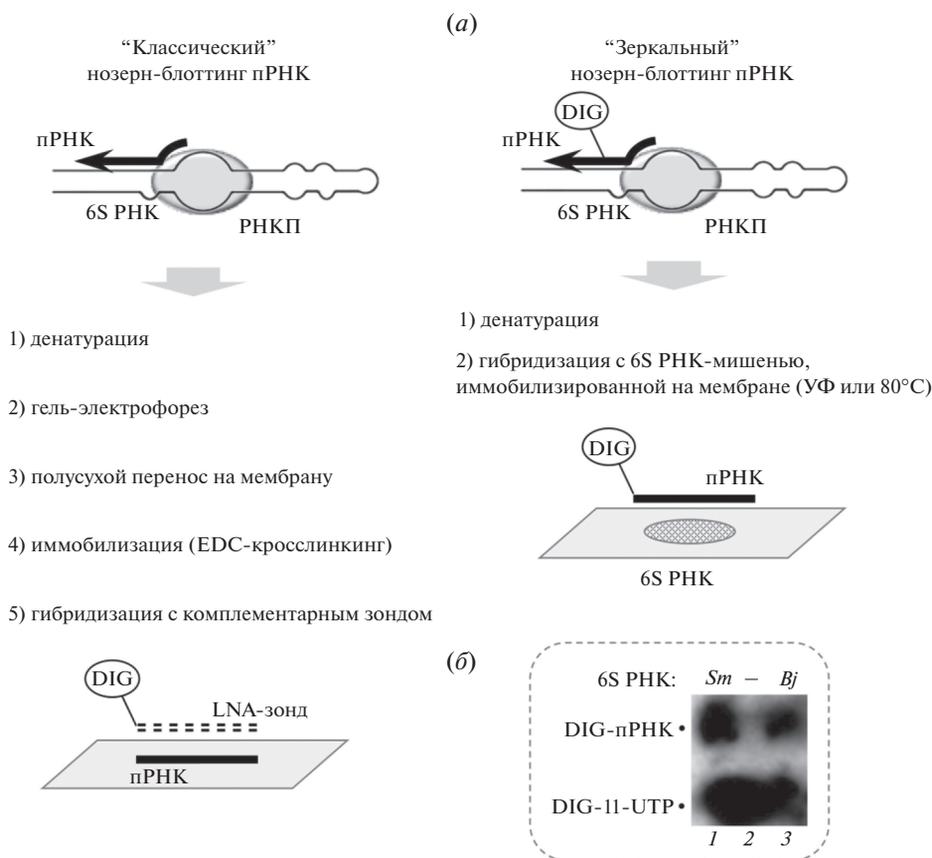
В большинстве случаев для доказательства синтеза пРНК с матрицы 6S РНК проводят эксперименты по транскрипции *in vitro* в присутствии различных  $^{32}\text{P}$ -меченных нуклеозидтри-

фосфатов (NTP) с последующим разделением продуктов реакции методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях [11]. Причем для изучения новых 6S РНК, выделенных из редких бактерий, возможно использовать “чужеродные” РНКП, например, РНКП *E. coli* или *B. subtilis*, а также коммерчески доступные ферменты [13]. Как правило, стартовая точка транскрипции располагается в центральном “пузыре” 6S РНК с 3'-конца молекулы (хотя в литературе описано несколько случаев синтеза пРНК с “обратной” стороны “пузыря” [4, 5]), что позволяет предсказать нуклеотидную последовательность образующихся пРНК. Однако интерпретация полученных результатов часто осложняется тем, что в процессе транскрипции образуется набор продуктов разной длины, а визуализация соответствующих сигналов зависит от используемого  $^{32}\text{P}$ -меченного NTP и нуклеотидного состава пРНК. Последовательный перебор меченых NTP и их комбинаций, а также условий транскрипции не всегда приводит к положительному результату и пониманию, с какой стороны 6S РНК происходит транскрипция. Поэтому для подтверждения ее специфичности также используют нозерн-блоттинг с зондами, комплементарными пРНК [12, 13].

Ранее мы охарактеризовали две новые 6S РНК из азотфиксирующих бактерий *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium meliloti* [13]. При исследовании синтеза пРНК в этих бактериях возникли сложности с подбором условий для эффективной транскрипции *in vitro* и, как следствие, трудности с определением стартовой точки и длин пРНК, необходимых для дизайна соответствующих комплементарных зондов для нозерн-блоттинга. Таким образом, актуальной задачей являлся поиск альтернативного способа проверки возможности синтеза пРНК на матрице 6S РНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе для детекции пРНК, образующихся в процессе транскрипции на матрице 6S РНК, был предложен метод “зеркального” нозерн-блоттинга. Основное отличие от “классического” протокола состоит в том, что метка содержится не в зонде, а непосредственно встраивается в пРНК в процессе транскрипции. В нашем случае для этих целей мы использовали коммерчески доступный DIG-11-UTP (Roche, Швейцария). Далее следует гибридизация DIG-меченной пРНК (если она была синтезирована в ходе транскрипции) с “материнской” 6S РНК-мишенью (рис. 1а), иммобилизованной непосредственно на мембране в виде “точек” (dot-blot). Таким образом “зондом” в данном случае выступает сама 6S РНК, не содержащая меток. Последующая детекция DIG с помощью хемолуминесценции является быстрой и безопасной альтернативой  $^{32}\text{P}$ -авторадио-



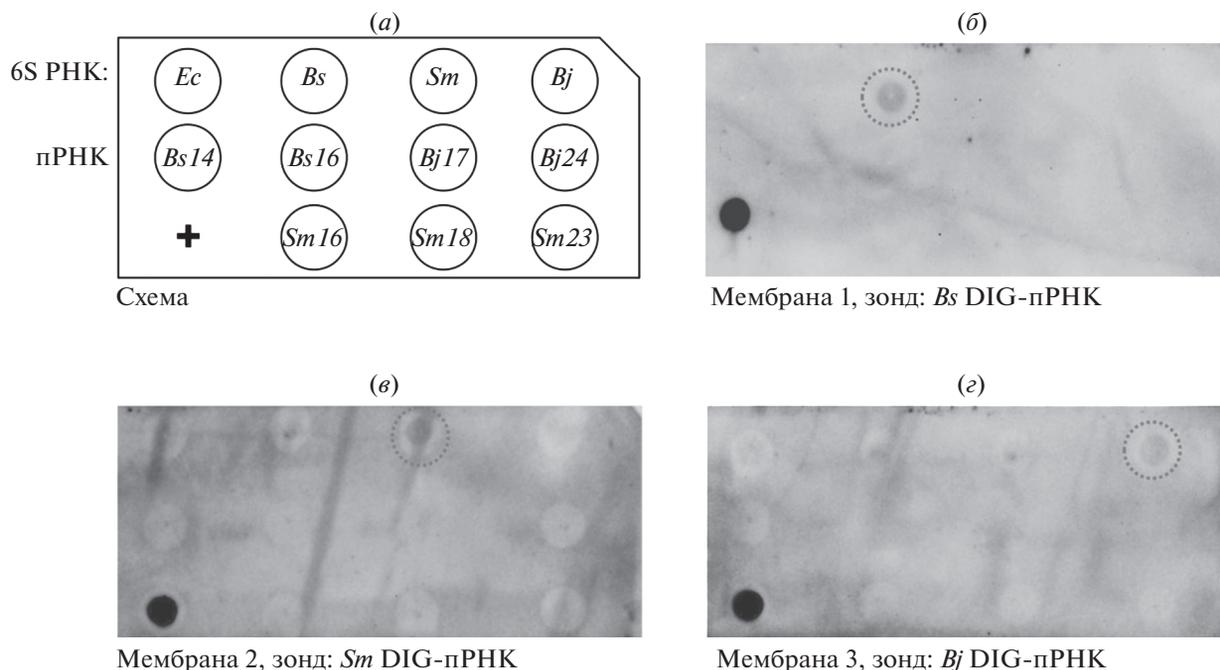
**Рис. 1.** (а) – Сравнение “классического” и “зеркального” методов детекции пРНК; (б) – анализ продуктов *in vitro* транскрипции с 6S РНК *S. meliloti* (*Sm*) и *B. japonicum* (*Bj*) в качестве матрицы для РНКП (дорожки 1 и 3) в присутствии DIG-11-УТР методом гель-электрофореза с последующим переносом *de novo* синтезированных пРНК на мембрану, иммобилизацией в присутствии EDC и непосредственной детекцией DIG с помощью хемоллюминесценции. Дорожка 2 – отрицательный контроль, реакция в отсутствие 6S РНК.

графии [14]. В результате такого эксперимента нельзя определить длину образующихся пРНК и предсказать их нуклеотидную последовательность, но можно быстро установить сам факт синтеза *de novo* транскриптов с матрицы 6S РНК.

Разработанный метод “зеркального” нозерн-блоттинга был верифицирован при анализе синтеза пРНК на 6S РНК из трех бактерий: *B. subtilis*, *S. meliloti* и *B. japonicum*. В реакции использовали “чужеродную” РНКП *E. coli*. Продукты трех *in vitro* транскрипций, проведенных в присутствии DIG-11-УТР, гибридизовали с тремя идентичными мембранами (рис. 2а), на которых были иммобилизованы соответствующие 6S РНК и различные синтетические олигорибонуклеотиды (отрицательные контроли). Для контроля детекции использовали 5'-DIG-меченный олигонуклеотид смешанной ДНК/LNA-природы, использованный ранее в работе Beckmann et al. [12]. Во всех трех случаях были получены специфические сигналы, соответствующие гибридизации пРНК с ее комплементарной 6S РНК-мишенью. Наиболее интенсивный сигнал визуализировался в случае пРНК

*B. subtilis* (рис. 2б), что согласуется с данными об ее крайне эффективном синтезе с матрицы 6S-1 РНК *B. subtilis* как в условиях *in vitro* [12, 13], так и *in vivo* [8]. В случае пРНК *S. meliloti* и *B. japonicum* аналогичные сигналы характеризовались существенно меньшей интенсивностью, что привело к более высокому уровню фоновых сигналов вплоть до визуализации разметки мембраны и мест иммобилизации РНК (рис. 2в, 2г). Мы также проанализировали продукты *in vitro* транскрипций с 6S РНК *S. meliloti* и *B. japonicum*, проведенных в присутствии DIG-11-УТР, “классическим” способом, включающим разделение продуктов реакции методом гель-электрофореза с последующей иммобилизацией и детекцией на мембране (см. “Эксперим. часть”). Как видно из рис. 1б, в обоих случаях – в присутствии 6S РНК *S. meliloti* и *B. japonicum* (но не в отсутствие 6S РНК) – наблюдали появление сигналов с меньшей электрофоретической подвижностью, которые были интерпретированы нами как DIG-меченные пРНК.

Отметим, что использование DIG-11-УТР в качестве метки является определенным лимити-



**Рис. 2.** “Зеркальный” точечный нозерн-блоттинг пРНК *B. subtilis* (*Bs*), *S. meliloti* (*Sm*) и *B. japonicum* (*Bj*). (а) – Схема эксперимента: использовали три одинаковые мембраны, на которые были точно иммобилизованы препараты 6S РНК (1 мкг каждой) и синтетические олигорибонуклеотиды *Bs14*, *Bs16*, *Bj17*, *Bj24*, *Sm16*, *Sm18* и *Sm23* (100 пмоль каждого, отрицательные контроли, см. “Эксперим. часть”); *Ec* – 6S РНК *E. coli*; (+) – положительный контроль детекции (DIG-меченный олигонуклеотид, 10 пмоль). Каждую мембрану гибридизовали с продуктами *in vitro* транскрипции на матрице 6S РНК *B. subtilis* (б), *S. meliloti* (в) или *B. japonicum* (г).

рующим фактором, поскольку может быть применимо только для пРНК, содержащих остаток уридина.

Таким образом, мы впервые предложили новый “альтернативный” метод детекции пРНК с помощью “инвертированного” или “зеркального” нозерн-блоттинга. Главным его преимуществом является отсутствие необходимости подбора и синтеза специфических зондов, поскольку это не всегда возможно (и не всегда необходимо) на начальных этапах исследования и при первичном скрининге различных мутантных 6S РНК или предполагаемых аналогов 6S РНК. Мы полагаем, что подобные эксперименты можно проводить и в радиоактивном варианте при достаточно высокой эффективности синтеза пРНК.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Подготовка мембран.** В данной работе были использованы препараты 6S РНК *S. meliloti*, *B. japonicum* и 6S-1 РНК *B. subtilis*, полученные с помощью T7-транскрипции и охарактеризованные ранее [11, 13], а также ряд олигорибонуклеотидов – аналогов пРНК, использованных в качестве отрицательных контролей: *Bs14*: 5'-GUUCGGU-CAAAACU-3'; *Bs16*: 5'-AAAGGUUAAAACUAAA-3';

*Sm16*: 5'-CGUGUAUGGCCCCCGGG-3'; *Sm18*: 5'-CGUGUAUGGCCCCCGGGGA-3'; *Sm23*: 5'-CGUGUAUGGCCCCCGGGGAUUGUG-3'; *Bj17*: 5'-CGAUAAGGCCCCCGGGGA-3'; *Bj24*: 5'-CGAUAAGGCCCCCGGGGAUUAUUGG-3' (синтезированы в Сколковском институте науки и технологий, Россия) [11, 13]. Водные растворы РНК в объеме 5 мкл, содержащие 1 мкг 6S РНК, 100 пмоль аналогов пРНК или 10 пмоль положительного контроля для детекции DIG (5'-DIG-aGttTtgAccGac-3', где T – остаток LNA, п – дезоксирибонуклеозид; синтезирован фирмой “Exicon”, Дания), предварительно денатурировали при 95°C (5 мин), быстро охлаждали во льду и сразу наносили на предварительно размеченную положительно заряженную нейлоновую мембрану (Roche, Швейцария) по схеме, приведенной на рис. 2а. Для иммобилизации РНК мембраны облучали УФ-светом (256 нм) в течение 5 мин, а затем прогревали 1 ч при 80°C. Перед гибридизацией мембрану помещали в пластиковый флакон объемом 50 мл с закручивающейся крышкой и промывали 5 мл буфера DIG Easy Hub (Roche, Швейцария) в течение 1 ч при медленном перемешивании.

**Транскрипция *in vitro*.** Перед реакцией транскрипции проводили ренатурацию 6S РНК (20 пмоль) в 13 мкл буфера TE (10 мМ Tris-HCl,

1 mM EDTA, pH 8.0): образец нагревали до 95°C (2 мин) и далее ступенчато охлаждали (0.5°C/10 с) в амплификаторе t100 (Bio-Rad, США). Затем препараты 6S РНК смешивали с 4 мкл буфера для транскрипции (финальная концентрация (ф.к.): 40 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) Triton X-100, pH 7.5) и 1 мкл (1 ед. акт.)  $\sigma^{70}$ -холофермента РНКП *E. coli* (New England Biolabs, США) и преинкубировали в течение 10 мин при 37°C для образования комплекса 6S РНК с РНКП. Реакцию инициировали добавлением 2 мкл смеси DIG RNA Labeling (Roche, Швейцария, ф.к.: 1 mM АТР, 1 mM СТР, 1 mM GTP, 650 мкМ UTP, 350 мкМ DIG-11-UTP, pH 7.5) с последующей инкубацией при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл буфера DIG Easy Hyb, прогревали 5 мин при 95°C и медленно добавляли к 5 мл буфера DIG Easy Hyb.

**Гибридизация и детекция.** Полученный раствор добавляли к промытой мембране и инкубировали в течение 16 ч при комнатной температуре при медленной ротации флакона. Дальнейшие манипуляции по отмывке мембраны и детекции сигналов проводили с помощью коммерческих наборов DIG Wash and Block Buffer Set и DIG Detection Kit (Roche, Швейцария) строго в соответствии с протоколом производителя. Сигналы хемолуминесценции визуализировали посредством системы гель-документации ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). На рис. 2 представлены результаты одного из трех независимых экспериментов (начиная со стадии транскрипции *in vitro*) с наиболее четкими сигналами люминесценции.

**Подтверждение синтеза DIG-меченных пРНК.** Для подтверждения синтеза DIG-пРНК *S. meliloti* и *B. japonicum* после окончания реакции в аликвоту целевой смеси (10 мкл) добавляли 10 мкл формамида, выдерживали при 95°C в течение 10 мин и наносили в 10%-ный неденатурирующий ПААГ. После проведения электрофореза (2 ч, 30 мА, 1× TBE) гель промывали в 0.5× TBE и с помощью прибора Semidry Blotter (Хеликон, Россия) переносили продукты реакции на положительно заряженную нейлоновую мембрану (Roche, Швейцария). Затем РНК иммобилизовали на мембране с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) [10]. Полученную мембрану тщательно промывали водой и далее проводили прямую детекцию пРНК с помощью коммерческих наборов DIG Wash and Block Buffer Set и DIG Detection Kit (Roche, Швейцария). На рис. 1б представлен результат одного из двух проведенных независимых экспериментов (начиная с реакции транскрипции *in vitro*).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доц., к.х.н. Т.С. Зацепину (Сколковский институт науки и технологий, Россия) за синтез олигорибонуклеотидов — аналогов пРНК.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-04-00791.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen J., Wassarman K.M., Feng S., Leon K., Feklistov A., Winkelman J.T., Li Z., Walz T., Campbell E.A., Darst S.A. // *Mol. Cell*. 2017. V. 68. P. 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.006>
2. Wassarman K.M. // *Microbiol. Spectrum*. 2018. V. 6. № 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0019-2018>
3. Wassarman K.M., Saecker R.M. // *Science*. 2006. V. 314. P. 1601–1603. <https://doi.org/10.1126/science.1134830>
4. Буренина О.Ю., Елкина Д.А., Хартманн Р.К., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. С. 1641–1661. [Burenina O.Y., Elkina D.A., Hartmann R.K., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // *Biochemistry (Mosc)*. 2015. V. 80. P. 1429–1446.] <https://doi.org/10.1134/S0006297915110048>
5. Wehner S., Damm K., Hartmann R.K., Marz M. // *RNA Biol*. 2014. V. 11. P. 1467–1478. <https://doi.org/10.4161/rna.29894>
6. Wurm R., Neusser T., Wagner R. // *Biol. Chem*. 2010. V. 391. P. 187–196. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.018>
7. Beckmann B.M., Hoch P.G., Marz M., Willkomm D.K., Salas M., Hartmann R.K. // *EMBO J*. 2012. V. 31. P. 1727–1738. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.23>
8. Hoch P.G., Schlereth J., Lechner M., Hartmann R.K. // *RNA*. 2016. V. 22. P. 614–622. <https://doi.org/10.1261/rna.055616.115>
9. Elkina D.A., Weber L., Lechner M., Burenina O.Y., Kubareva E.A., Hartmann R.K., Klug G. // *RNA Biol*. 2017. V. 14. P. 1627–1637. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1342933>
10. Damm K., Bach S., Müller K.M., Klug G., Burenina O.Y., Kubareva E.A., Grünweller A., Hartmann R.K. // *Methods Mol. Biol*. 2015. V. 1296. P. 41–51. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2547-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2547-6_5)

11. Burenina O.Y., Hoch P.G., Damm K., Salas M., Zatsepin T.S., Lechner M., Oretskaya T.S., Kubareva, E.A., Hartmann R.K. // RNA. 2014. V. 20. P. 348–359. <https://doi.org/10.1261/rna.042077.113>
12. Beckmann B.M., Burenina O.Y., Hoch P.G., Kubareva E.A., Sharma C.M., Hartmann R.K. // RNA Biol. 2011. V. 8. P. 839–849. <https://doi.org/10.4161/rna.8.5.16151>
13. Burenina O.Y., Elkina D.A., Migur M.Y., Oretskaya T.S., Evgueniya-Hackenberg E., Hartmann R.K., Kubareva E.A. // J. Microbiol. 2020. V. 58. P. 945–956. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-0283-1>
14. Kim S.W., Li Z., Moore P.S., Monaghan A.P., Chang Y., Nichols M., John B. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. P. e98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1235>

## Detection of Small pRNA – Products of Transcription from 6S RNA – by “Mirror-Like” Northern Blot Hybridization

O. Y. Burenina\*, \*\*, #, T. S. Oretskaya\*\*, and E. A. Kubareva\*\*

#Phone: +7 (495) 939-54-11; e-mail: [alunit@inbox.ru](mailto:alunit@inbox.ru)

\*Skolkovo Institute of Science and Technology, ul. Nobelya 3, Moscow, 121205 Russia

\*\*Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

Investigation of RNAs with a length less than 30 nucleotides, in particular, microRNAs and other extremely short non-coding RNAs, is often associated with difficulties in detecting them not only *in vivo*, but also *in vitro*. One of these molecules is bacterial pRNA (“product RNA”) that is synthesized by RNA polymerase on 6S RNA as a template. The classical method for identifying pRNA is Northern blot hybridization with complementary DNA probes containing various labels and modified nucleosides. However, this method is not suitable for searching for new pRNAs which sequences are unknown. It is also quite expensive and time-consuming. We have proposed a new simple way to determine the fact of pRNA synthesis on the template of 6S RNA that we called “mirror-like” Northern blotting. It does not require gel electrophoresis, and the pRNA, newly formed during transcription, act as a probe itself due to containing digoxigenin (DIG) residues. This approach will allow fast screening of new 6S RNAs or their mutant variants for their ability to serve as templates for pRNA synthesis and the estimation of its efficacy.

*Keywords:* 6S RNA, pRNA, Northern blotting, digoxigenin



## ФОТОАКТИВИРУЕМАЯ СИСТЕМА CRISPR/Cas9

© 2021 г. Е. А. Ахметова\*, \*\*, \*\*\*, В. М. Голышев\*, \*\*\*, И. П. Вохтанцев\*, \*\*\*,  
М. И. Мещанинова\*, А. Г. Веньямина\*, Д. С. Новопашина\*, \*\*, \*\*\*, #

\*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

\*\* Научно-технологический университет “Сириус”, Россия, 354383 Сочи, Олимпийский просп., 1

\*\*\* Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Поступила в редакцию 18.09.2020 г.

После доработки 28.09.2020 г.

Принята к публикации 30.09.2020 г.

Разработан подход к созданию фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9, содержащей белок Cas9, синтетическую 102-звенную sgРНК или пару направляющих crРНК/tracrРНК и блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды. Фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды содержат два или три фоторасщепляемых линкера в своем составе. Термическая стабильность комплексов таких модифицированных олигонуклеотидов с направляющими РНК уменьшалась с увеличением количества линкеров. Исследована кинетика фоторасщепления фотомодифицированных блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов. Продемонстрирована *in vitro* возможность фотоактивации геномного редактирования в результате УФ-облучения при использовании фоторасщепляемых блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов в системе CRISPR/Cas9.

**Ключевые слова:** фоторасщепляемый линкер, направляющие РНК для системы CRISPR/Cas9, фото-блокирующий олигодезоксирибонуклеотид, фотоактивируемое редактирование генома *in vitro*

**DOI:** 10.31857/S0132342321020020

## ВВЕДЕНИЕ

Облучение светом определенной длины волны позволяет эффективно управлять активностью различных молекулярно-биологических систем *in vitro* и *in vivo* [1–3]. Введение светочувствительных молекул в состав олигонуклеотидов или белков дает возможность изменять их активность в клетках с высоким пространственно-временным разрешением. В литературе описаны конструкции, которые можно активировать, например, за счет удаления фотоблокирующей группы под действием света, изменения их вторичной структуры в результате смены конформации введенного фоточувствительного линкера или внесения разрывов в их структуру путем гидролиза фоторасщепляемого линкера. На сегодняшний день известны разнообразные фоторегулируемые конструкции на ос-

нове малых интерферирующих РНК (siРНК) [4, 5], микроРНК [6, 7], антисмысловых олигонуклеотидов [8, 9], каталитических нуклеиновых кислот [10, 11], аптамеров [12], а также направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 [13–18].

CRISPR-системы, в частности системы CRISPR/Cas9 [19, 20], являются перспективным инструментом редактирования генома. Эффекторные комплексы направляющих РНК и Cas-белков позволяют вносить разрывы в заданные положения ДНК или РНК. В качестве направляющих РНК в системе CRISPR/Cas9 используют природный вариант из двух молекул РНК – crРНК, содержащей участок связывания с ДНК-мишенью и участок связывания со второй молекулой РНК, а именно tracrРНК, взаимодействующей с белком Cas9. Другим вариантом является использование химерной протяженной sgРНК, объединяющей в себе последовательности crРНК и tracrРНК [19].

На данный момент предложены два варианта создания фотоактивируемых систем CRISPR/Cas9. Первый вариант подразумевает создание направляющих РНК, содержащих фотогруппы в гетероциклических основаниях, которые блокируют активность CRISPR-системы до облучения светом [13–17]. Во втором варианте используют бло-

Сокращения: CRISPR – регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов (clustered regularly interspaced short palindromic repeats); crРНК – CRISPR РНК; PAM – мотив, прилегающий к протоспейсеру (protospacer adjacent motif); PL – 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиол; sgРНК – объединенная направляющая рибонуклеиновая кислота (single guide RNA); siРНК – малые интерферирующие РНК; tracrРНК – *транс*-активирующая CRISPR РНК (*trans*-activating CRISPR RNA).

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-29; факс: +7 (383) 363-51-53; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

Таблица 1. Последовательности и молекулярные массы блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов

| Шифр             | Последовательность, 5'–3'                              | Молекулярная масса |          |
|------------------|--|--------------------|----------|
|                  |  | рассчитано         | найдено* |
| <b>B20_PL3</b>   | TTTTTT-PL-ACAAA-PL-TTGAG-PL-TTATCC                     | 7421.71            | –        |
| <b>B30_PL2</b>   | GCTCTAAAAC-PL-TTTTTTACAA-PL-ATTGAGTTAT                 | 9657.20            | –        |
| <b>B30_PL3</b>   | GCTCTAAA-PL-ACTTTTT-PL-TACAAAT-PL-TGAGTTAT             | 9901.32            | –        |
| <b>B30_PL2_F</b> | <i>Flu</i> -GCTCTAAAAC-PL-TTTTTTACAA-PL-ATTGAGTTAT     | 10225.69           | –        |
| <b>B30_PL3_F</b> | <i>Flu</i> -GCTCTAAA-PL-ACTTTTT-PL-TACAAAT-PL-TGAGTTAT | 10469.81           | –        |
| <b>B20</b>       | TTTTTTACAAATTGAGTTATCC                                 | 6689.36            | 6690.34  |
| <b>B30</b>       | GCTCTAAAACTTTTTACAAATTGAGTTAT                          | 9168.94            | 9169.02  |

\* По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Прочерком обозначены случаи, когда не удалось зарегистрировать масс-спектр.

**PL** – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола; **Flu** – остаток флуоресцеина, введенный по 5'-фосфату через аминоксильный линкер.

кирующие олигонуклеотиды, содержащие один или несколько фоторасщепляемых линкеров на основе 1-(2-нитрофенил)-пропандиола (PL), комплементарные направляющей sgРНК [18]. Такие блокирующие олигонуклеотиды связываются с sgРНК, образуя комплементарный дуплекс, не позволяющий sgРНК сформировать комплекс с ДНК-мишенью и инициировать работу системы CRISPR/Cas9 вплоть до облучения светом.

Целью данного исследования являлась разработка фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9, содержащей белок Cas9, синтетическую 102-звенную sgРНК или пару направляющих sgРНК/tracrРНК и блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды, и сравнительное изучение влияния длины блокирующего олигонуклеотида и количества фоторасщепляемых линкеров в его составе на эффективность активации обоих вариантов систем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9 нами были синтезированы фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные фрагменту направляющей РНК в области связывания с ДНК-мишенью по аналогии с работой Jain et al. [18].

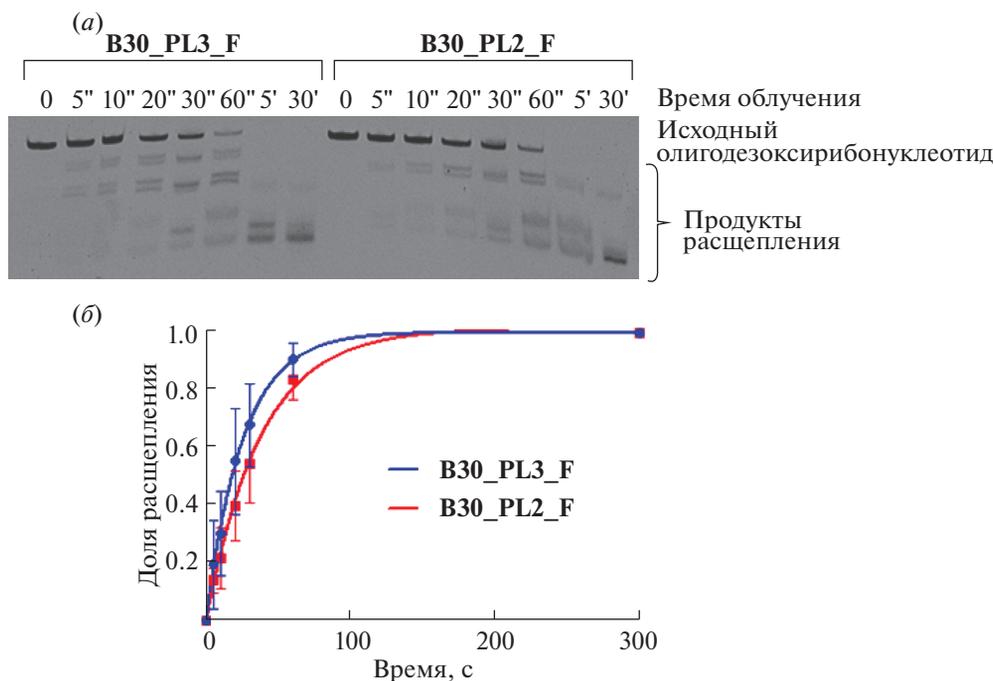
Для введения фоторасщепляемого линкера был синтезирован фосфитамида на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL) [4, 8]. С его использованием в ходе автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза была получена серия фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных фрагменту направляющей РНК, участвующей в образовании комплекса с ДНК-мишенью (табл. 1). Кроме того, были получены немодифицированные олигодезоксирибонуклео-

тиды такой же последовательности, не содержащие фоторасщепляемых линкеров.

Все олигодезоксирибонуклеотиды и их производные выделяли методом препаративного гель-электрофореза. Следует отметить, что электрофоретическая подвижность олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих фоторасщепляемый линкер, была меньше в сравнении с подвижностью немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов с такой же нуклеотидной последовательностью. Строение олигонуклеотидов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии (табл. 1). Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие фоторасщепляемый линкер, скорее всего, гидролизуются по положениям введения фоторасщепляемых линкеров в процессе ионизации лазером, в результате чего не удалось получить спектры целых молекул. В масс-спектрах обнаруживали лишь пики, соответствующие массам фрагментов олигодезоксирибонуклеотидов, образующихся при гидролизе.

Кинетику расщепления олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих фоторасщепляемые линкеры, исследовали путем анализа облученных в течение определенного времени светом с длиной волны 365 нм водных растворов их 5'-флуоресцеин-модифицированных аналогов методом денатурирующего гель-электрофореза с флуоресцентной визуализацией геля (рис. 1а).

Сравнительное исследование расщепления флуоресцентно-меченых олигодезоксирибонуклеотидов (**B30\_PL3\_F** и **B30\_PL2\_F**), содержащих фоторасщепляемые линкеры, показало, что полное расщепление обоих олигодезоксирибонуклеотидов происходит уже через 5 мин облучения (рис. 1б). При этом полное расщепление олигодезоксирибонуклеотида с тремя фотолabileными вставками происходит быстрее.



**Рис. 1.** (а) – Пример электрофоретического анализа расщепления флуоресцентно-меченых фотомодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов **B30\_PL3\_F** и **B30\_PL2\_F**; (б) – кинетические кривые расщепления **B30\_PL3\_F** и **B30\_PL2\_F**.

В качестве направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 автоматическим твердофазным фосфитамидным методом были синтезированы 102-звенная sgРНК и пара crРНК/tracrРНК (табл. 2).

С использованием плазмиды pBS2SKM Psp2 TTG на основе вектора pBluescript II SK(–) со вставкой протоспейсерной последовательности и РАМ (5'-TGG-3') в качестве ДНК-мишени проводили исследование способности фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных направляющей РНК, блокировать работу системы CRISPR/Cas9 до облучения и активировать ее действие после облучения. Блокирующие олигонуклеотиды были сконструированы таким образом, чтобы образовывать комплементарный дуплекс с направляющей РНК и препятствовать

формированию комплекса с двуцепочечной ДНК-мишенью (плазмидой) (рис. 2).

В результате облучения блокирующий олигодезоксирибонуклеотид гидролизуется по сайтам введения фоторасщепляемых линкеров, и РНК высвобождается из дуплекса, после чего запускается действие системы CRISPR/Cas9.

Предварительно была проверена термическая стабильность дуплексов блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих фоторасщепляемые линкеры, с направляющей РНК на примере crРНК (рис. 3).

Сравнительное исследование показало, что введение фоторасщепляемых линкеров уменьшает термическую стабильность дуплексов блокирующих олигонуклеотидов с crРНК, при этом увеличение числа линкеров также отрицательно ска-

**Таблица 2.** Последовательности химически синтезированных направляющих РНК

| РНК (длина)      | Последовательность олигодезоксирибонуклеотида*, 5'–3'  |
|------------------|--|
| sgРНК (102 нт)   | GG <u>AUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG-CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU |
| crРНК (42 нт)    | <u>AUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUU  |
| tracrРНК (74 нт) | AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC-CGAGUCGGUGCUUUUUU                                      |

\* Подчеркнута область взаимодействия с двуцепочечной ДНК-мишенью.

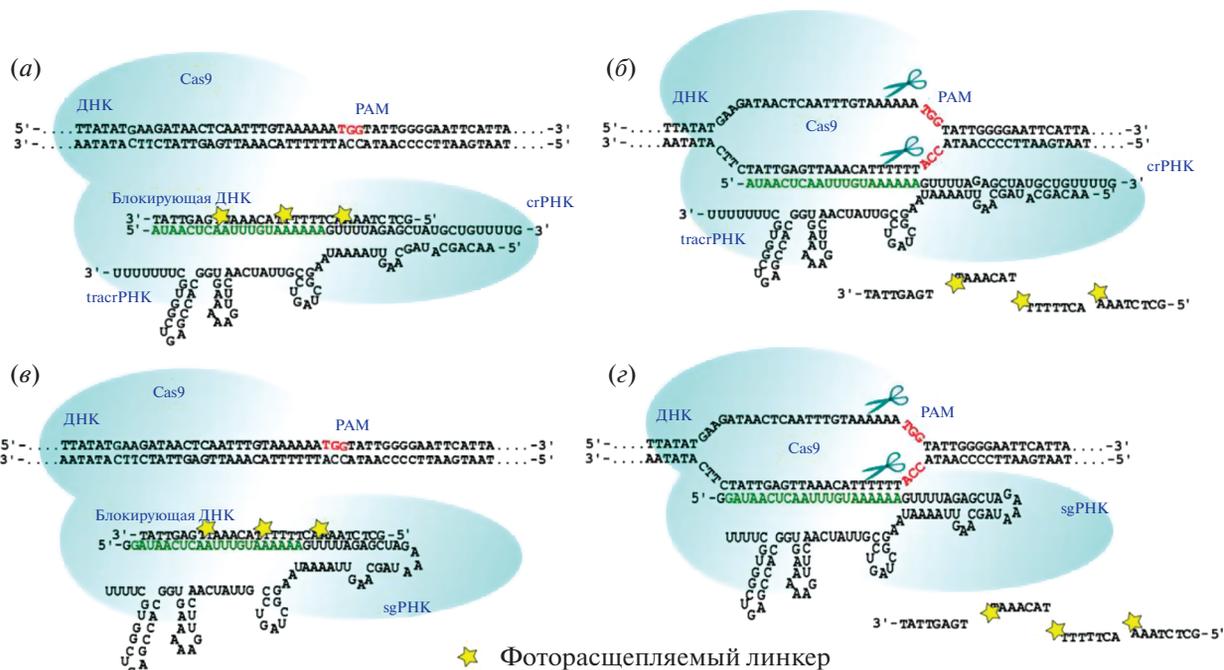


Рис. 2. Система CRISPR/Cas9, включающая двуцепочечную ДНК-мишень, направляющие РНК и блокирующие фоторасщепляемые ДНК до облучения (а, в) и после облучения (б, г). (а, б) – Система, содержащая пару направляющих crPHK/tracrPHK; (в, г) – система, содержащая химерную направляющую sgPHK.



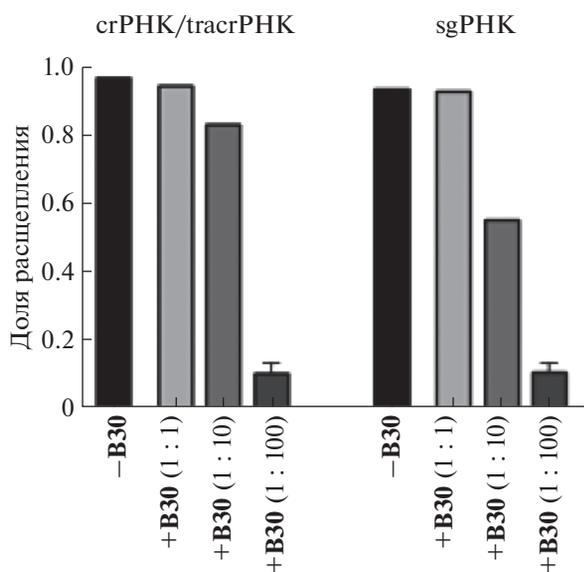
Рис. 3. Температуры плавления структурированной РНК-мишени (crPHK) и ее дуплексов с блокирующими олигонуклеотидами (B20 и B30) и их фотомодифицированными аналогами (B20\_PL3, B30\_PL2 и B30\_PL3). Условия см. в “Эксперим. части”.

зывается на стабильности. Как и ожидалось, более протяженные олигодезоксирибонуклеотиды формировали более стабильные дуплексы.

В результате исследования расщепления плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК и блокирующих ДНК оказалось, что необходимо достаточно большой избыток блокирующих ДНК для ингибирования системы CRISPR/Cas9. Так, 10-кратный избыток блокирующего олигонуклеотида B30 снижал эффективность расщепления мишени лишь незначительно (рис. 4). Для

сравнительного исследования нами был выбран вариант с использованием 100-кратного избытка блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов.

При расщеплении суперскрученной плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК регистрировали образование в основном линейной плазмиды и незначительное количество релаксированной формы плазмиды, содержащей один ник (разрыв в одной из цепей) (рис. 5а, 5б). Результаты сравнительного анализа расщепления ДНК-мишени показали, что в боль-



**Рис. 4.** Анализ расщепления плазмидной ДНК-мишени комплексами crPNC/tracrPNC/Cas9 и sgPNC/Cas9 в присутствии 10-кратного (1 : 10) и 100-кратного (1 : 100) избытка 30-звенного блокирующего немодифицированного олигодезоксирибонуклеотида **B30**. Условия см. в “Эксперим. части”.

шей степени снижается активность CRISPR-системы при использовании 30-звенных блокирующих олигонуклеотидов по сравнению с 20-звенными олигонуклеотидами, что согласуется со стабильностью их гетеродуплексов с crPNC. Введение фотолabile модификаций в структуру блокирующих олигонуклеотидов снижает уровень ингибирования действия CRISPR-системы. При этом наблюдали более высокий уровень ингибирования для комплексов Cas9 с sgPNC. Во всех случаях облучение светом длиной волны 365 нм в течение 30 мин позволяло восстановить активность CRISPR-системы (рис. 5в, 5з).

Кинетический анализ расщепления плазмиды также проводили, используя 100-кратный избыток блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов по отношению к направляющим PNC (рис. 6).

При использовании блокирующих фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов **B30\_PL3** и **B30\_PL2** наблюдали значительное снижение уровня расщепления мишени. Облучение олигонуклеотида с тремя фотолинкерами в течение 30 мин приводило к практически полному восстановлению активности CRISPR-системы, в то время как облучение олигонуклеотидов с двумя линкерами восстанавливало уровень расщепления лишь частично.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что предложенная система CRISPR/Cas9 может быть использована для фотоконтролируемого редактирования генов *in vitro*. Для ис-

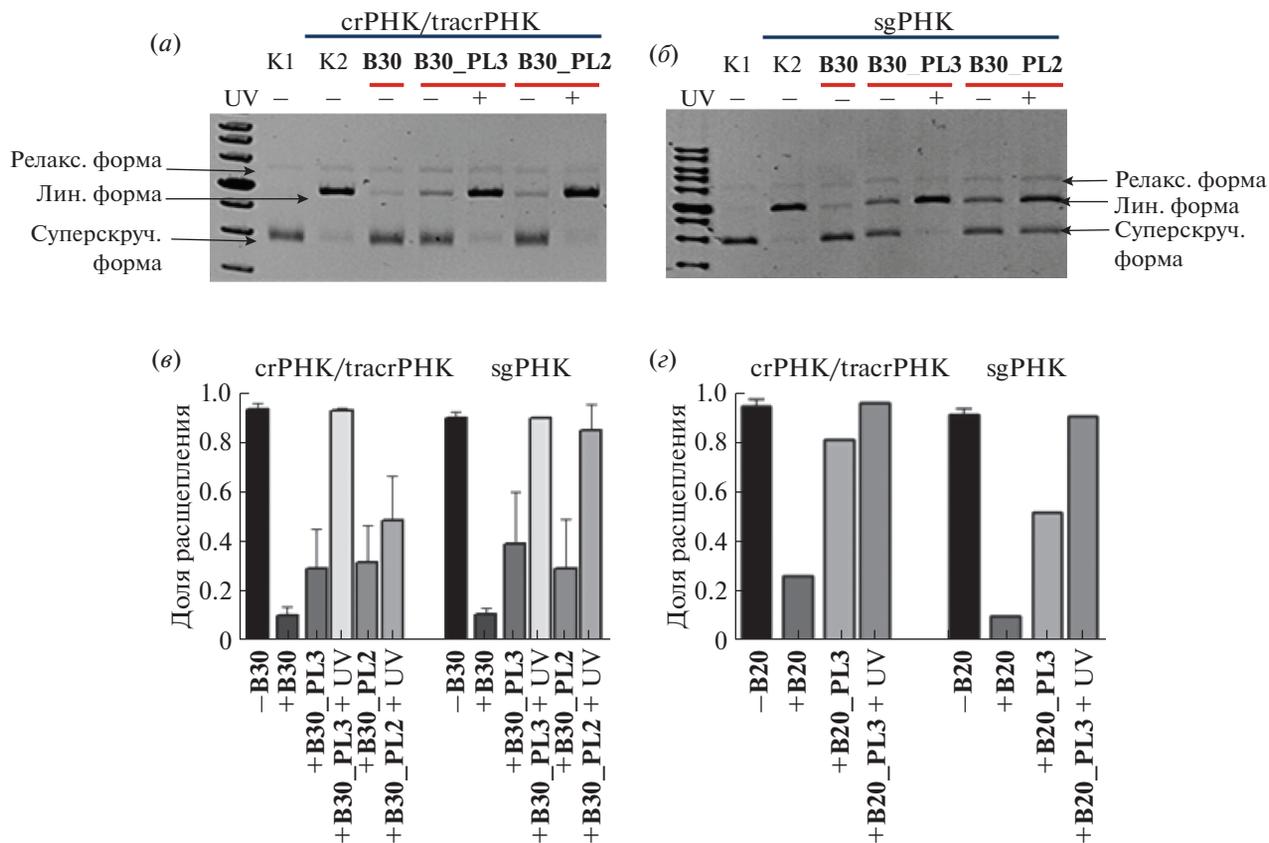
пользования этой системы *in vivo* необходимы дополнительные исследования с учетом особенностей проведения геномного редактирования в живых клетках.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** В работе были использованы следующие реактивы: перхлорат натрия, *N*-метилмидазол (Acros Organics, США); 4,4'-диметокситритилхлорид (Alfa Aesar, США), полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил), 2'-*O*-третбутилдиметилсил-*N*-ацетилзащищенные рибонуклеозид-3'-фосфитамида, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил), 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-*N*-ацетилзащищенные дезоксирибонуклеозид-3'-фосфитамида (ChemGenes, США); краситель “Stains-all”, персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид, 2,6-лутидин, бромистый этидий, Трис(гидроксиметил)аминометан (Fluka, Швейцария); фосфитамид флуоресцеина (GlenResearch, США); мочевины, 40%-ный водный раствор метиламина, молекулярные сита “Trap-Pac™ Molecular Sieve Bag” 3 Å (Millipore, США); агароза (MP, США); ацетон, пиридин, тетрагидрофуран, формамид, пропионовый ангидрид (PanReac, Испания); ксиленилдиаминтетрауксусная кислота (Serva, Германия); 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиол, триэтиламин, 5-этилтио-1*H*-тетразол, триэтиламинтригидрофторид, этокситриметилсилан, 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамид (Sigma-Aldrich, США); хлористый метилен, бикарбонат натрия, йод кристаллический, гексан (Реахим, Россия); ацетонитрил (ХимМед, Россия), а также другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства.

Рекомбинантная эндонуклеаза Cas9 и плаزمиды pBS2SKM Psp2 TTG на основе вектора pBlue-script II SK(-) со вставкой протоспейсерной последовательности и PAM (5'-TGG-3') получены согласно стандартному протоколу [21].

**Оборудование.** Все водные растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США). Концентрирование растворов олигонуклеотидов производили на вакуумном концентраторе Concentrator Plus (Eppendorf, США). Осажденные из растворов олигонуклеотиды центрифугировали на центрифуге MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия). Перемешивание растворов осуществляли с помощью Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия). Оптическую плотность растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Тонкослойную хро-



**Рис. 5.** Электрофореграммы продуктов расщепления ДНК-мишени (релаксированной формы плазмиды, содержащей один ник (одноцепочечный разрыв), и линейной формы плазмиды, содержащей двуцепочечный разрыв) комплексами crPHK/tracrPHK (а) и sgPHK (б) с Cas9 в присутствии 30-звенных блокирующих олигонуклеотидов. К1 – исходная ДНК-мишень, К2 – продукты расщепления ДНК-мишени белком Cas9 в присутствии соответствующих направляющих РНК. Анализ расщепления плазмидной суперскрученной ДНК-мишени белком Cas9 с парой направляющих crPHK/tracrPHK или с направляющей sgPHK в присутствии 100-кратного избытка фоточувствительных блокирующих 30-звенных (в) и 20-звенных (г) олигонуклеотидов до и после облучения светом с длиной волны 365 нм.

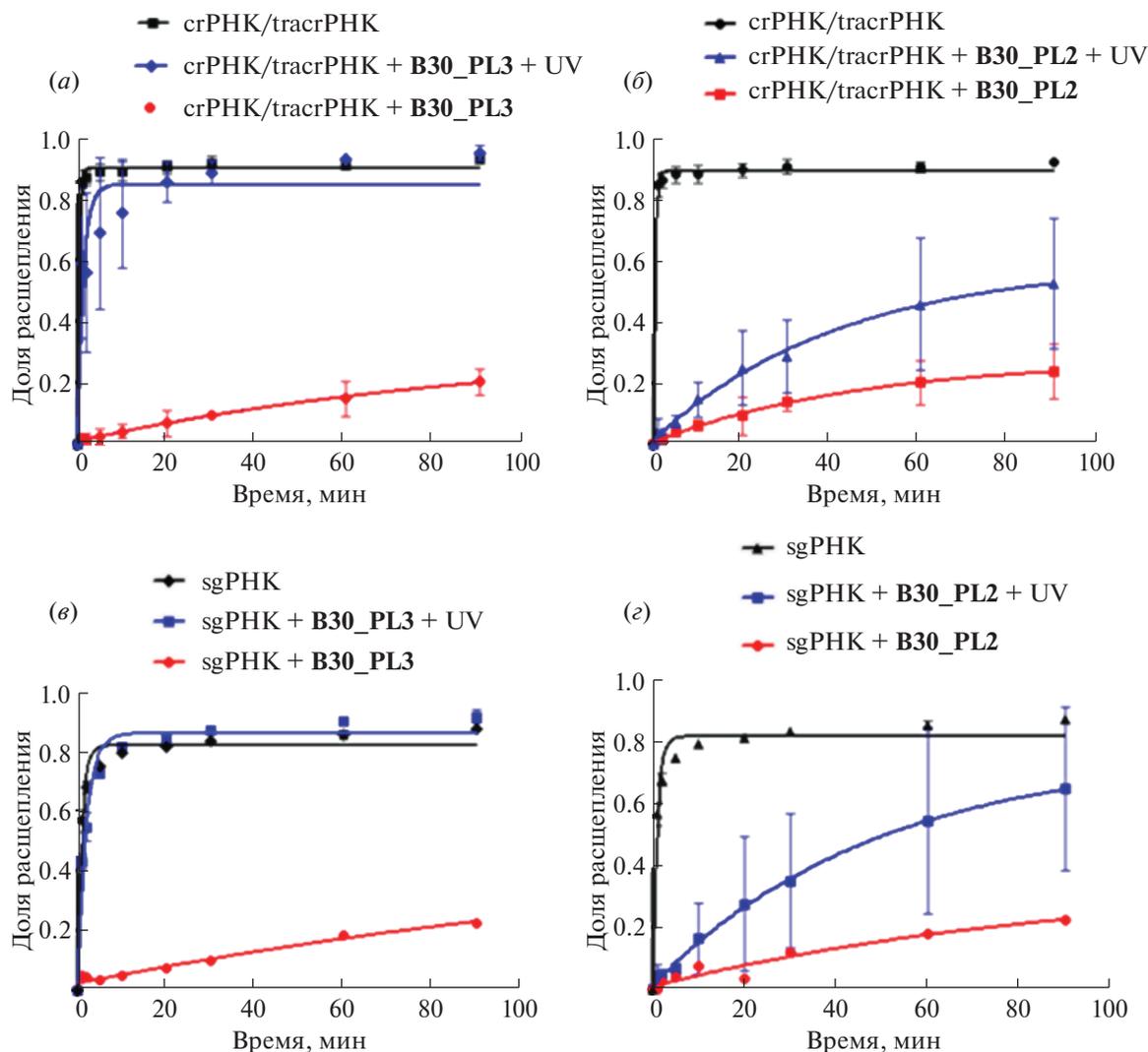
матографию проводили на пластинках DC-Alufo-  
lien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия).

**Синтез 2-О-4,4'-диметокситритил-1-(2-нитро-  
фенил)-1,2-этандиола (I).** Синтез проводили по  
анalogии с работами Ji et al. [4] и Tang et al. [8] с  
небольшими изменениями. К раствору 200 мг  
1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (1.1 ммоль) в  
1 мл абс. пиридина добавляли раствор 406.6 мг  
4,4'-диметокситритилхлорида (1.2 ммоль) в 3 мл  
абс. пиридина и проводили реакцию в течение  
часа. За глубиной протекания реакции следили с  
помощью тонкослойной хроматографии (система  
А этилацетат : гексан, 2 : 8). После прохожде-  
ния реакции добавляли 0.5 мл метанола для разло-  
жения избытка 4,4'-диметокситритилхлорида. Ре-  
акционную смесь после упаривания растворяли в  
хлористом метиле и проводили экстракцию на-  
сыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Объединенные  
органические слои сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и  
упаривали досуха. Выделение продукта проводили  
методом колоночной хроматографии на силикаге-

ле в градиенте концентрации этилацетата в гекса-  
не (0–35%). R<sub>f</sub> 0.11. Выход реакции составил 85%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ, м.д.: 7.85 (d, 1H),  
7.82 (d, 1H), 7.62 (t, 1H), 7.42–7.35 (m, 3H), 7.30–  
7.16 (m, 11H), 6.78 (m, 4H), 5.50 (dd, 1H), 3.78 (s,  
7H), 3.62 (dd, 1H), 3.16 (dd, 1H).

**Синтез 1-(2-циано-N,N-диизопрропилфосфит-  
амид)-2-О-4,4'-диметокситритил-1-(2-нитрофенил)-  
1,2-этандиола (II).** Синтез проводили по анало-  
гии с работой Ji et al. [4] с небольшими изменени-  
ями. К раствору 480 мг (1 ммоль) соединения (I) в  
3 мл абс. ацетонитрила добавляли раствор, содер-  
жавший 195 мг 5-этилтиотетразола в 1.2 мл абсо-  
лютного ацетонитрила и 300 мкл N,N-диизопрро-  
пилэтиламина, а затем 625 мкл (2 ммоль) 2-циа-  
ноэтил-N,N,N',N'-тетраизопрропилфосфитамида.  
За прохождением реакции следили с помощью  
ТСХ (система Б хлороформ : гексан : этилацетат,  
4 : 4 : 2). После прохождения реакции к реакцион-  
ной смеси добавляли 6 мл этилацетата, раствор  
над осадком отбирали, осадок промывали не-



**Рис. 6.** Кинетические кривые расщепления плазмидной ДНК-мишени комплексом crPHK/tracrPHK/Cas9 в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов B30\_PL3 (а) и B30\_PL2 (б) и комплексом sgPHK/Cas9 в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов B30\_PL3 (в) и B30\_PL2 (г).

сколько раз этилацетатом. Реакционную смесь экстрагировали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные органические слои сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали досуха. Продукт выделяли из реакционной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле в градиенте концентрации этилацетата в гексане (0–30%).  $R_f$  0.80. Выход реакции составил 61%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ , м.д.: 7.89 (d, 1H), 7.80–7.76 (d, 1H), 7.59–7.51 (t, 2H), 7.41–7.33 (m, 3H), 7.29–7.10 (m, 13H), 6.80–6.72 (m, 5H), 5.81–5.72 (m, 1H), 3.90–3.80 (m, 10H), 3.56–3.38 (m, 3H), 3.27–3.20 (m, 1H), 2.63–2.38 (m, 2H), 2.04–1.02 (m, 1H), 1.28–1.11 (m, 12H), 0.94–0.80 (d, 7H).  
 $^{31}\text{P}$ -ЯМР (150 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.1.

**Фосфитамидный синтез олигонуклеотидов.** Олигонуклеотиды были получены на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом в реакторах объемом 50 мкл согласно оптимизированному для данного прибора синтетическому протоколу. Введение фосфитамида (II) в олигодезоксирибонуклеотиды проводили с использованием его 0.1 М раствора в абс. ацетонитриле в течение 30 мин. Флуоресцеин вводили на 5'-конец олигонуклеотидов в ходе фосфитамидного синтеза по протоколу, рекомендованному производителем. Олигонуклеотиды деблокировали и отделяли от полимерного носителя 40%-ным раствором метиламина в течение 15 мин (20 мин для 102-звенного олигорибонуклеотида) при  $65^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании или, в случае 5'-флуоресцеин-

содержащих олигонуклеотидов, 30%-ным водным раствором аммиака при комнатной температуре в течение 16 ч. В случае олигорибонуклеотидов удаление 2'-*O*-TBDMSi-защитных групп с олигорибонуклеотидов проводили с использованием свежеприготовленного раствора *N*-метилпирролидинон : Et<sub>3</sub>N : Et<sub>3</sub>N · 3HF (1.5 : 0.75 : 1, v/v/v) при 65°C при перемешивании в течение 1.5 ч, добавляли этокситриметилсилан, через 10 мин проводили осаждение олигорибонуклеотидов диэтиловым эфиром.

**Анализ гомогенности олигонуклеотидов.** Гомогенность полученных олигонуклеотидов подтверждали методом гель-электрофореза в 12%-ном (акриламид : *N,N'*-метиленабисакриламид 30 : 0.5) или 15%-ном (акриламид : *N,N'*-метиленабисакриламид 29 : 1) ПААГ в денатурирующих условиях (8 М мочевины, 50 мМ Трис-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.3, 0.1 М Na<sub>2</sub>ЭДТА). Для нанесения на гель использовали 5 мкл раствора 8 М мочевины с содержанием 0.025% ксиленианолового FF. Для визуализации олигонуклеотидов использовали раствор красителя "Stains-all", приготовленный из 50 мг красителя "Stains-all" и 100 мл смеси вода-формамид (1 : 1). После окрашивания гели сушили на приборе GelDryer model 583 (Bio-Rad, США).

**Выделение олигонуклеотидов и их конъюгатов методом препаративного гель-электрофореза.** Деблокированные олигонуклеотиды и конъюгаты выделяли с помощью препаративного гель-электрофореза в денатурирующем 12%-ном или 15%-ном ПААГ в вышеуказанных условиях. Визуализировали олигонуклеотиды в геле при наложении геля на пластину DC-Alufohlen Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в свете УФ-лампы ( $\lambda = 254$  нм). В случае фоточувствительных олигодезоксирибонуклеотидов во избежание активации реакции расщепления под воздействием УФ-излучения закрывали стеклом основную часть геля, содержащую продукт, оставляя только небольшую его часть, достаточную для визуализации. Олигонуклеотиды элюировали из геля 0.3 М раствором перхлората натрия или, в случае протяженных РНК, 0.3 М раствором ацетата натрия (pH 5.2), после чего проводили обессоливание с использованием Tet-Pak C18 Cartridge (Millipore, США) или осаждение спиртом соответственно.

Осаждали олигонуклеотиды из водных растворов в виде натриевых солей десятикратным объемом 2%-ного раствора перхлората натрия в ацетоне. Протяженные олигорибонуклеотиды осаждали из 0.3 М раствора ацетата натрия (pH 5.2) четырехкратным объемом этилового спирта при -20°C как минимум в течение 2 ч. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали охлажденным 80%-ным этиловым спиртом и сушили досуха на воздухе.

**Исследование кинетики расщепления фотомодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов при облучении.** Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие фоторасщепляемые линкеры и остаток флуоресцеина на 5'-конце (B30\_PL2\_F и B30\_PL3\_F), в виде растворов с концентрацией 10 мкМ в воде или в буфере (20 мМ HEPES, pH 7.5, 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25% глицерина) облучали светом с длиной волны 365 нм в течение 1, 2, 5, 10, 15 и 30 мин. Продукты расщепления анализировали в денатурирующем 15%-ном ПААГ с последующей визуализацией УФ-облучением на длине волны 312 нм с использованием прибора для гель-документации Quantum Vilber Lourmat (Vilber Lourmat, Франция). Для получения количественных характеристик изображения переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США). Долю расщепления модифицированного олигодезоксирибонуклеотида рассчитывали в программном продукте Microsoft Excel. Параметры рассчитывали в программном пакете GraphPad Prism 5.0.4.533 (GraphPad, США) с использованием уравнения:

$$f_a = P_{st} (1 - e^{-k_1 t}),$$

где  $f_a$  – доля продукта реакции,  $P_{st}$  – доля продукта при переходе реакции в стационарную фазу (предельная степень расщепления),  $k_1$  – константа реакции псевдопервого порядка,  $t$  – время реакции.

**Термическая денатурация дуплексов направляющих РНК с блокирующими олигодезоксирибонуклеотидами.** Дифференциальные кривые термической денатурации дуплексов были получены на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе спектрофотометра Cary 300 BioMelt (Varian Inc., Австралия). Концентрации олигонуклеотидных компонентов 1 мкМ в буфере 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (pH 7.4), 1 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА. Изменение температуры проводили со скоростью 0.5°C/мин. Детекцию поглощения осуществляли на двух длинах волн (260 и 270 нм). Обработку кривых термической денатурации и ренатурации проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, США). Температуры плавления были определены как максимумы первых производных кривых плавления по температуре.

**Расщепление плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК.** Реакцию проводили в 10 мкл раствора, содержавшего 20 мМ HEPES (pH 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25% глицерина. Контрольный раствор содержал все компоненты, кроме направляющей РНК и белка Cas9.

Первоначально проводили сборку эффекторного комплекса. Для этого в буфер добавляли 1.35 мкл (1 мкМ, 1.35 пмоль) направляющей РНК, а в случае пары направляющих *cr*РНК/*tracr*РНК – по 1.35 мкл (1 мкМ, 1.35 пмоль) каждой РНК и 0.602 мкл раствора белка Cas9 (2.24 мкМ, 1.35 пмоль) в 50-кратном избытке по отношению к плазмиде *pBS2SKM*. Растворы перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C. Пары *cr*РНК/*tracr*РНК до добавления Cas9 предварительно инкубировали 5 мин при 90°C и охлаждали до 25°C. Затем в каждую пробирку добавляли 1 мкл раствора (50 нг/мкл, 27 фмоль) плазмиды *pBS2SKM*, содержащей протоспейсер и последовательность РАМ (5'-TGG-3'). Перемешивали реакционные смеси и инкубировали в течение часа при 37°C в условиях отсутствия прямого солнечного света. Для остановки реакции к реакционной смеси добавляли 2.5 мкл раствора, содержавшего 250 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина.

При анализе активности CRISPR-систем в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов сначала инкубировали 5 мин при 90°C гетеродуплекс 1.35 мкл направляющей *cr*РНК или *sg*РНК (1 мкМ, 1.35 пмоль) с эквимольным количеством блокирующего олигонуклеотида или с 10- или 100-кратным его избытком, добавляя 1.35 мкл 1, 10 или 100 мкМ раствора блокирующего олигодезоксирибонуклеотида соответственно, и остужали до 25°C. Затем добавляли Cas9 и инкубировали эффекторный рибонуклеопротеиновый комплекс 15 мин при 37°C.

Деактивацию блокирующих фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов проводили путем облучения их растворов в течение 30 мин УФ-светом ( $\lambda = 365$  нм).

**Исследование кинетики расщепления плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК.** Реакцию проводили в 85 мкл раствора, содержавшего 20 мМ HEPES (рН 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25% глицерина. Для сборки эффекторного комплекса в буфер добавляли 3.5 мкл (1 мкМ, 3.5 пмоль) направляющей *sg*РНК, а в случае пары направляющих *cr*РНК/*tracr*РНК – по 3.5 мкл (1 мкМ, 3.5 пмоль) каждой РНК, и 1.56 мкл раствора белка Cas9 (5.8 мкМ, 3.5 пмоль) в 15-кратном избытке по отношению к плазмиде *pBS2SKM*. Растворы перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C. Пары *cr*РНК/*tracr*РНК до добавления Cas9 предварительно инкубировали 5 мин при 90°C и остужали до 25°C. При анализе активности CRISPR-систем в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов сначала инкубировали 5 мин при 90°C гетеродуплекс 3.5 мкл направляющей *cr*РНК или *sg*РНК (1 мкМ, 3.5 пмоль) с 3.5 мкл

(100 мкМ, 0.35 нмоль, 100-кратный избыток) раствора блокирующего олигодезоксирибонуклеотида и остужали до 25°C. После этого добавляли 1.56 мкл раствора Cas9 (5.8 мкМ, 3.50 пмоль) и инкубировали комплекс 15 мин при 37°C. Аналогичным образом готовили растворы, содержащие блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды, дезактивированные УФ-облучением в течение 30 мин ( $\lambda = 365$  нм).

После сборки эффекторного комплекса в каждую пробирку добавляли 8.5 мкл раствора (50 нг/мкл, 0.233 пмоль) плазмиды *pBS2SKM*. Реакционные смеси перемешивали и инкубировали в течение 1.5 ч при 37°C в условиях отсутствия прямого солнечного света. Для остановки реакции отбирали аликвоты 10 мкл через 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60 и 90 мин и добавляли их в пробирки с 2.5 мкл раствора, содержавшего 250 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина.

**Анализ эффективности расщепления плазмиды.** Эффективность реакции расщепления суперскрученной формы плазмиды до релаксированной и линейной форм плазмиды белком Cas9 в присутствии направляющих РНК анализировали методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (4 мМ Трис, 3 мМ CH<sub>3</sub>COOH, 0.07 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА) с добавлением 2.5 мкл этидий бромида (концентрация – 10 мг/мл). На гель наносили 10 мкл реакционной смеси в Quenching Buffer (250 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина). Для контроля подвижности в геле продуктов расщепления использовали ДНК-маркер 1 kb, длина фрагментов от 250 до 10000 п.н. (СибЭнзим, Россия). Проводили визуализацию с использованием системы гель-документации Quantum (Vilber Lourmat, Франция). Для получения количественных характеристик изображения переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

Долю расщепления плазмиды рассчитывали по следующим формулам:

$$N_{\Sigma} = \frac{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \times 100\%,$$

$$N_{dsDNA} = \frac{I_{\text{лин}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \times 100\%,$$

$$N_{ssDNA} = \frac{I_{\text{рел}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \times 100\%,$$

где  $N_{\Sigma}$  – суммарное расщепление плазмиды;  $N_{dsDNA}$  – расщепление двух цепей ДНК плазмиды;  $N_{ssDNA}$  – расщепление одной цепи ДНК плазмиды;  $I_{\text{лин}}$  – интенсивность полосы, соответствующей ли-

нейной форме плазмиды;  $I_{\text{рел}}$  – интенсивность полосы, соответствующей релаксированной форме плазмиды;  $I_{\text{суперск}}$  – интенсивность полосы, соответствующей суперскрученной форме плазмиды;  $k = 1.14$  – коэффициент эффективности окрашивания суперскрученной формы ДНК относительно релаксированной формы [22].

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Черносовой (Центр масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за регистрацию масс-спектров олигонуклеотидов.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-51026. Оптимизация синтеза протяженных олигорибонуклеотидов проведена при финансовой поддержке базового бюджетного финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210021-7.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hartmann D., Smith J.M., Mazzotti G., Chowdhry R., Booth M.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2020. V. 48. P. 1645–1659. <https://doi.org/10.1042/BST20200014>
- Wu Y., Yang Z., Lu Y. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2020. V. 57. P. 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.05.003>
- Ruble B.K., Yeldell S.B., Dmochowski I.J. // *J. Inorg. Biochem.* 2015. V. 150. P. 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.010>
- Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., Tang X. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016. V. 55. P. 2152–2156. <https://doi.org/10.1002/anie.201510921>
- Shah S., Jain P.K., Kala A., Karunakaran D., Friedman S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 4508–4517. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp415>
- Gripenburg J.C., Ruble B.K., Dmochowski I.J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 6198–6204. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.082>
- Connelly C.M., Uprety R., Hemphill J., Deiters A. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 2987–2993. <https://doi.org/10.1039/c2mb25175b>
- Tang X., Su M., Yu L., Lv C., Wang J., Li Z. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 3848–3855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq079>
- Wu L., Wang Y., Wu J., Lv C., Wang J., Tang X. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 677–686. <https://doi.org/10.1093/nar/gks996>
- Korman A., Sun H., Hua B., Yang H., Capilato J.N., Paul R., Panja S., Ha T., Greenberg M.M., Woodson S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. P. 12080–12086. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003425117>
- Young D.D., Lively M.O., Deiters A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 6183–6193. <https://doi.org/10.1021/ja100710j>
- Feng M., Ruan Z., Shang J., Xiao L., Tong A., Xiang Y. // *Bioconjug. Chem.* 2017. V. 28. P. 549–555. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00646>
- Zhou W., Brown W., Bardhan A., Delaney M., Ilk A.S., Rauen R.R., Kahn S.I., Tsang M., Deiters A. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020. V. 59. P. 8998–9003. <https://doi.org/10.1002/anie.201914575>
- Tamaitree L., Brown T. // *ACS Cent. Sci.* 2020. V. 6. P. 616–618. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00350>
- Moroz-Omori E.V., Satyapertiwi D., Ramel M.-C., Høgsset H., Sunyovszki I.K., Liu X., Wojciechowski J.P., Zhang Y., Grigsby C.L., Brito L., Bugeon L., Dallman M.J., Stevens M.M. // *ACS Cent. Sci.* 2020. V. 6. P. 695–703. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01093>
- Liu Y., Zou R.S., He S., Nihongaki Y., Li X., Razavi S., Wu B., Ha T. // *Science.* 2020. V. 368. P. 1265–1269. <https://doi.org/10.1126/science.aay8204>
- Zhang Y., Ling X., Su X., Zhang S., Wang J., Zhang P., Feng W., Zhu Y.Y., Liu T., Tang X. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020. V. 59. <https://doi.org/10.1002/anie.202009890>
- Jain P.K., Ramanan V., Schepers A.G., Dalvie N.S., Panda A., Fleming H.E., Bhatia S.N. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016. V. 55. P. 12440–12444. <https://doi.org/10.1002/anie.201606123>
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // *Science.* 2012. V. 337. P. 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829.2012>
- Khadempar S., Familghadakchi S., Motlagh R.A., Farahani N., Dashtiahangar M., Rezaei H., Gheibi Hayat S.M. // *J. Cell Physiol.* 2019. V. 234. P. 5751–5761. <https://doi.org/10.1002/jcp.27476>
- Anders C., Jinek M. // *Methods Enzymol.* 2014. V. 546. P. 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5>
- Shubsda M.F., Goodisman J., Dabrowiak J.C. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1997. V. 34. P. 73–79. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(96\)01204-3](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(96)01204-3)

## Photoactivatable System CRISPR/Cas9

**E. A. Akhmetova\***, \*\*, \*\*\*, **V. M. Golyshev\***, \*\*\*, **I. P. Vokhtantcev\***, \*\*\*,  
**M. I. Meschaninova\***, **A. G. Venyaminova\***, and **D. S. Novopashina\***, \*\*, \*\*\*, #

#Phone: +7 (383) 363-51-29; fax: +7 (383) 363-51-53; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

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

\*\*Sirius University of Science and Technology, Olimpijskij prosp. 1, Sochi, 354383 Russia

\*\*\*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

The approach to design of photoactivatable CRISPR/Cas9 system consisted of Cas9 protein, synthetic 102-nt sgRNA or pair of guide crRNA/tracrRNA and blocking photocleavable oligodeoxyribonucleotides was developed. Photocleavable oligodeoxyribonucleotides contained two or three photodegradable linkers in their structure. Thermal stability of complexes of these modified oligonucleotides with guide crRNA decreased upon increasing of linker quantity. Kinetic of photomodified oligodeoxyribonucleotides cleavage was investigated. The possibility of *in vitro* photoactivation gene editing after UV-irradiation using photomodified blocking oligodeoxyribonucleotides in CRISPR/Cas9 system was demonstrated.

*Keywords: photocleavable linker, guide RNAs for CRISPR/Cas9 system, photoblocking oligodeoxyribonucleotide, photoactivatable gene editing in vitro*



УДК 577.113(7+4)

## ПРОБЛЕМЫ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ АНХИМЕРНОГО ЭФФЕКТА

© 2021 г. Е. С. Дюдеева\*, А. С. Павлова\*,

М. С. Купрюшкин\*, Д. В. Пышный\*, \*\*, И. А. Пышная\*.,#

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

\*\*Новосибирский научно-исследовательский государственный университет,  
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принята к публикации 11.09.2020 г.

Установлено, что наличие свободной ОН-группы на 3'-концевом остатке замещенного этиленгликолевого фрагмента в составе производного фосфорилгуанидинового олигодезоксирибонуклеотида является фактором, определяющим нестабильность структуры целевого олигонуклеотидного продукта в условиях стандартного протокола деблокирования. Показано, что основными побочными продуктами реализации такого анхимерного эффекта ОН-группы являются продукты реакции трансэтерификации фосфорилгуанидинового (ФГ) звена, несущего остаток О-замещенного этиленгликоля. Данные масс-спектрометрического анализа показывают, что в щелочных условиях происходит накопление производных, лишенных остатка  $N,N,N',N'$ -замещенного гуанидина (1,3-диметилимидазолидин-2-имин, DMI), либо всего 3'-концевого ФГ-содержащего нуклеотидного звена.

*Ключевые слова:* модифицированные олигонуклеотиды, фосфорилгуанидины, масс-спектрометрия, анхимерный эффект

DOI: 10.31857/S0132342321020093

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день широкий спектр научно-исследовательских и прикладных задач тем или иным образом задействует аналоги нуклеиновых кислот (НК) – синтетические олигонуклеотиды (ОН), которые при помощи различных химических модификаций наделяют необходимыми дополнительными функциональными свойствами. Введение химических модификаций в ОН позволяет “регулировать” их свойства в соответствии с решаемой задачей [1, 2]. Например, стабильность ОН по отношению к нуклеазам достигается при введении фосфотиоатных [3], 2'-ОМе и 2'-F-нуклеотидных звеньев [4]. Для повышения сродства олигонуклеотида к комплементарной НК-

мишени используют различные модификации углеводородного остова (например, “замкнутые” нуклеотидные звенья [5]). Наличие пептидилнуклеиновых остатков [6], морфолиновых нуклеотидов [7] или фосфорилгуанидиновых остатков [8, 9] в составе ОН приводит к эффективной гибридизации ОН с НК-мишенью в условиях растворов с низкой ионной силой. Введение различных нуклеотидных вставок в состав ОН направлено изменяет их гибридизационные свойства [10]. Олигонуклеотиды, несущие остаток биотина [11], широко используют для получения функционализированных поверхностей биосенсоров, биочипов и т.д.

Следует заметить, что синтез производных ОН, содержащих сразу несколько различных модификаций, часто является нетривиальной задачей, тем более в условиях стандартного автоматического амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов: использование коммерчески доступных нуклеотидных мономеров и полимерных носителей накладывает свои ограничения. Так, мы обнаружили, что выход целевого продукта синтеза фосфорилгуанидинового олигодезоксирибонуклеотида (ФГО), в составе которого присутствует 3'-концевая не-

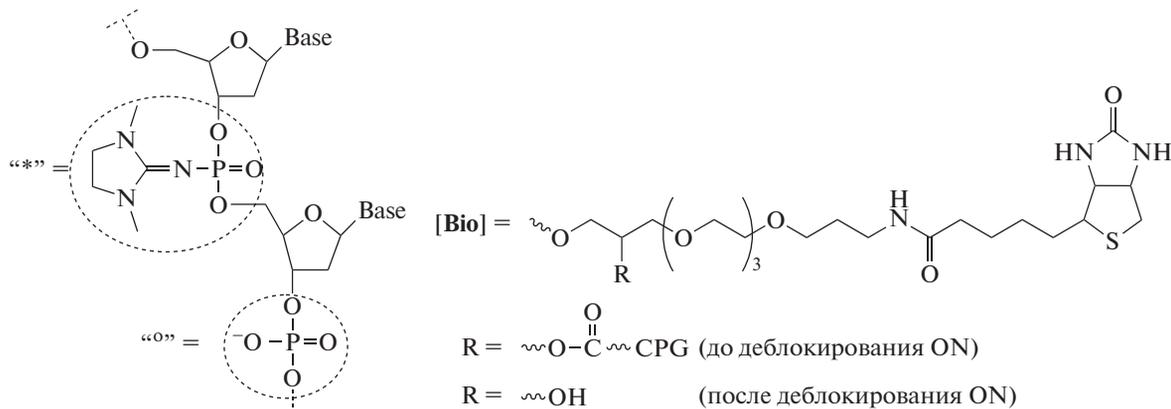
Сокращения: СРГ – стекло с контролируемым размером пор; DMI – 1,3-диметилимидазолидин-2-имин, остаток  $N,N,N',N'$ -замещенного гуанидина; ESI MS – метод масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией; ОН – олигонуклеотид; НК – нуклеиновая кислота, префикс d (дезоксирибо-) опущен (если не указано иное); ОФХ – обращенно-фазовая хроматография; ФГ – фосфорилгуанидиновое звено; ФГО – фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды.

# Автор для связи: (эл. почта: pyshnaya@niboch.nsc.ru).

(a)

| ON                                    | Последовательность (5'→3')  |
|---------------------------------------|---|
| <i>N26</i> <sup>o</sup>               | C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> G <sup>o</sup> C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> G <sup>o</sup> G <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> C <sup>o</sup> G <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> G <sup>o</sup> C <sup>o</sup> G <sup>o</sup> C <sup>o</sup> C <sup>o</sup> -[Bio] |
| <i>N26</i> <sup>*</sup>               | C*T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T*G*C*G*C*C*- [Bio]   |
| <i>N25</i> <sup>*1</sup> <sup>o</sup> | C*T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T*G*C*G*C*C <sup>o</sup> - [Bio]  |

(б)



**Рис. 1.** (a) – Обозначения и нуклеотидная последовательность исследуемых олигодезоксирибонуклеотидов, где “°” – нативная фосфатная группа, “\*” – фосфорилгуанидиновая группа; (б) – основные структурные элементы исследуемых олигонуклеотидов. Base – азотистые основания, CPG – полимерный носитель, стекло с контролируемым размером пор.

нуклеотидная вставка, содержащая этиленгликолевый линкер (рис. 1), значительно ниже такового для нативного олигонуклеотида. Ранее мы провели детальный анализ превращений, реализующихся при получении ФГО в рамках автоматического ДНК-синтеза [12]. С помощью модельных химических соединений было установлено, что нестабильной формой фосфорилгуанидина является заряженный триэфирный фосфорилгуанидиневый фрагмент, перевод которого в электронейтральную диэфирную форму обеспечивает стабильность ФГ-звена в условиях деблокирования, повышая выход целевого ON.

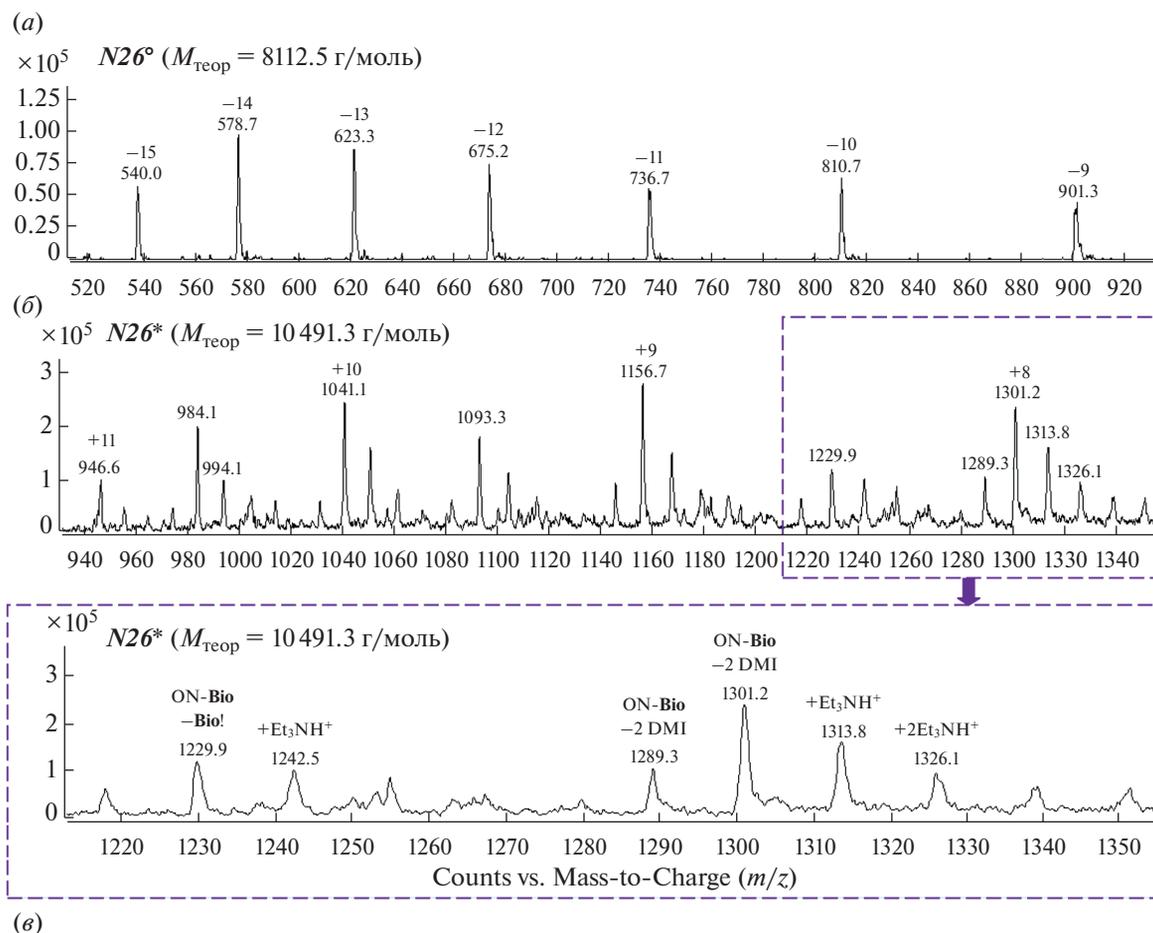
Данная работа направлена на исследование проблемы существенного уменьшения выхода целевого продукта синтеза ФГО, содержащего 3'-концевой нуклеотидный фрагмент, и выявление факторов, обеспечивающих результативность синтеза этих производных. С использованием методов масс-спектрометрического анализа, SDS-гель-электрофореза и обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) установлено, что ФГ-звено, находящееся вблизи нуклеотидной вставки на основе замещенного фрагмента этиленгликоля (рис. 1), нестабильно в условиях стандартного

протокола деблокирования ON, т.е. при обработке концентрированным водным раствором аммиака.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы разобраться в проблеме существенного снижения выхода 3'-функционализированных производных ФГО на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе, мы синтезировали 3'-биотиновые производные 26-звенного олигодезоксирибонуклеотида, остов которого содержал либо только заряженные фосфатные группы (*N26*<sup>o</sup>, рис. 1a), либо только ФГ-остатки (*N26*<sup>\*</sup>, рис. 1a). Синтез проводили по амидофосфитному протоколу, описанному в работах [8, 12, 13].

Все олигонуклеотиды были синтезированы с использованием коммерчески доступного CPG-носителя (см. “Эксперим. часть”). В состав данного носителя входит нуклеотидное звено, содержащее биотиновый остаток на триэтиленгликолевом линкере (рис. 1б), и в ходе автоматического синтеза ДНК к нему присоединяются нуклеотиды, образуя необходимую последовательность. Разрыв связи полученных олигонуклеотидов с CPG-носителем и дальнейшее деблокирование защитных групп олигонуклеотида осуществляли в условиях



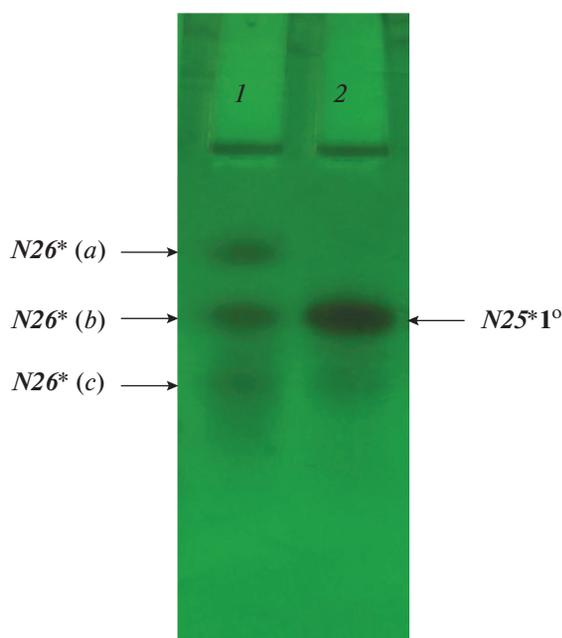
| $m/z$  | $z$ | $M_{\text{ион}}$ | Возможные продукты деструкции $N26^*$                       |
|--------|-----|------------------|---|
| 1229.9 | +8  | 9839.2           | [ON] + 7[H <sup>+</sup> ] + [Li <sup>+</sup> ]              |
| 1289.3 | +8  | 10314.4          | [ON-Bio] + 7[H <sup>+</sup> ] + [Li <sup>+</sup> ] - 2[DMI] |
| 1301.1 | +8  | 10408.8          | [ON-Bio] + 7[H <sup>+</sup> ] - [DMI] + [Li <sup>+</sup> ]  |

Рис. 2. Результаты анализа олигодезоксирибонуклеотидов  $N26^{\circ}$  (а) и  $N26^*$  (б) методом ESI MS; (в) – значения  $m/z$ , соответствующие основным продуктам деструкции  $N26^*$  – утере нуклеотидного звена, одного или двух остатков DMI.

стандартного протокола деблокирования ON, т.е. при обработке концентрированным водным раствором аммиака. Целевой продукт синтеза, в состав которого входило нуклеотидное биотиновое звено в виде, приведенном на рис. 1б ( $R = OH$ ), выделяли методом ВЭЖХ на обращенной фазе в линейном градиенте ацетонитрила. Характеризацию выделенных производных олигонуклеотидов проводили методом масс-спектрометрии с электрораспрей-ионизацией (ESI MS). Немодифицированный олигомер  $N26^{\circ}$  детектировали в виде полианионов. В случае ФГО  $N26^*$  в анализируемый образец добавляли муравьиную кислоту и детектировали образуемые поликатионы. Стоит отметить, что ФГ-остатки, в отличие от амидофосфат-

ных аналогов, стабильны в кислых и щелочных условиях [8, 13]. Масс-спектры олигонуклеотидов  $N26^{\circ}$  и  $N26^*$  приведены на рис. 2.

В случае нативного  $N26^{\circ}$  полученный профиль масс-спектра содержал группу пиков, соответствующих различным зарядовым формам ( $z = -15 \dots -9$ ) данного олигонуклеотида (рис. 2а). Сопоставимых по интенсивности пиков, соответствующих побочным продуктам, в спектре не обнаруживали. Масс-спектр  $N26^*$  имел сложный вид (рис. 2б). Для каждой зарядовой формы мы обнаружили группы пиков, отличающихся по значениям  $m/z$ . Рассмотрим одну из таких групп более подробно. Прежде всего, видно, что ФГО детектируется как



**Рис. 3.** Результат электрофоретического анализа биотининовых ФГО в 15%-ном денатурирующем SDS-ПААГ: 1 –  $N26^*$ , 2 –  $N25^*1^\circ$ .

поликатион, содержащий в т.ч. катионы триэтил-аммония (“ТЕА”, компонент буферной смеси). За счет этого мы наблюдали смещение  $m/z$  в сторону больших значений. Например, два пика с отношением  $m/z$  1313.8 и 1326.1 являются своего рода “аналогами” пика  $m/z$  1301.2. Таким образом, сигналы  $m/z$  1301.2, 1313.8 и 1326.1 отвечают одной и той же зарядовой форме  $z = +8$  одной молекулы, но с различными “видами” катионов, вошедших в структуру детектированного поликатиона:  $[M + H]^{+8}$ ,  $[M + TEA + H]^{+8}$ ,  $[M + 2TEA + H]^{+8}$  соответственно. В спектре  $N26^*$  присутствовали также и пики с меньшими значениями  $m/z$ , что свидетельствовало, вероятно, о деградации целевого продукта синтеза. При этом мы не обнаружили значения массы молекулярных ионов, соответствующих полноразмерному продукту синтеза, в котором содержались бы все 25 остатков  $N,N,N',N'$ -замещенного гуанидина (1,3-диметил-имидазолидин-2-имин, DMI): все наблюдаемые пики соответствовали утере либо хотя бы одного остатка DMI, либо всего биотин-содержащего нуклеотидного звена (рис. 2в).

Дополнительно был проанализирован в режиме детекции поликатионов олигонуклеотид  $N26^*$ . В полученном спектре отсутствовали пики, свидетельствующие о деградации этого немодифицированного олигонуклеотида (данные не приведены). Поскольку процедуры пробоподготовки и самого масс-спектрометрического анализа не приводили к деградации биотинилированного олигонуклеотида, то, вероятно, в случае  $N26^*$  именно

непосредственная близость ФГ-группы и нуклеотидного звена на 3'-конце ОН приводит к разрушению целевого продукта на каком-то из этапов синтеза и/или выделения олигонуклеотида. Чтобы проверить это предположение, был синтезирован олигодезоксирибонуклеотид  $N25^*1^\circ$  (рис. 1а), в котором между первым (с 3'-конца последовательности) нуклеотидным и нуклеотидным звеньями был сохранен немодифицированный фосфодиэфирный остаток. Постсинтетическую обработку и выделение целевого продукта проводили согласно приемам олигонуклеотидного синтеза, описанным выше. Полученный продукт  $N25^*1^\circ$  был также охарактеризован методом масс-спектрометрии, и в спектре не было обнаружено пиков, отвечающих “утере” нуклеотидного звена (данные не приведены). С помощью метода SDS-гель-электрофореза, адаптированного нами ранее для анализа частично заряженных и электронейтральных аналогов олигонуклеотидов [14], было проведено сравнение продуктов синтеза  $N26^*$  и  $N25^*1^\circ$  (рис. 3).

Для полностью ФГ-замещенного  $N26^*$  (рис. 3, дорожка 1) мы наблюдали три отдельных пятна. Вероятно, они соответствуют обнаруженным с помощью масс-спектров продуктам распада, т.е. либо утере биотин-содержащего звена с сохранением всех остатков DMI, либо, наоборот, утере одного или двух остатков DMI с сохранением биотининового звена (рис. 2б). Действительно, при отсутствии нуклеотидного звена олигонуклеотид  $N26^*$  сохраняет свою электронейтральность, и верхнее пятно (а) в дорожке 1 может соответствовать ОН с незаряженным остовом. В случае утери остатков DMI остов  $N26^*$  приобретает отрицательный заряд, и это должно привести к увеличению электрофоретической подвижности. Соответственно, пятна (b) и (c) могут быть продуктами деструкции, в которых сохранено нуклеотидное звено, но утерян один или два остатка DMI. В дорожке 2, где присутствует аналогичный по нуклеотидной последовательности ФГО  $N25^*1^\circ$ , есть только одно пятно, и его электрофоретическая подвижность полностью совпадает с таковой для пятна (b) в дорожке 1. Таким образом, видно, что при наличии ФГ-группы в 3'-концевой позиции вблизи нуклеотидного звена  $N26^*$  деградирует с образованием трех продуктов в сопоставимых количествах. Принимая во внимание этот факт, а также химическую структуру терминального нуклеотидного звена (рис. 1б), мы предположили, что, вероятно, реализуется “анхимерное содействие”, согласно которому деструкция ФГ-группы ускоряется соседней ОН-группой линкера на основе замещенного этиленгликолевого остатка, входящего в состав нуклеотидного звена.

**Модель деструкции 3'-функционализированных производных ФГО.** ФГ-группа в межнуклеозид-

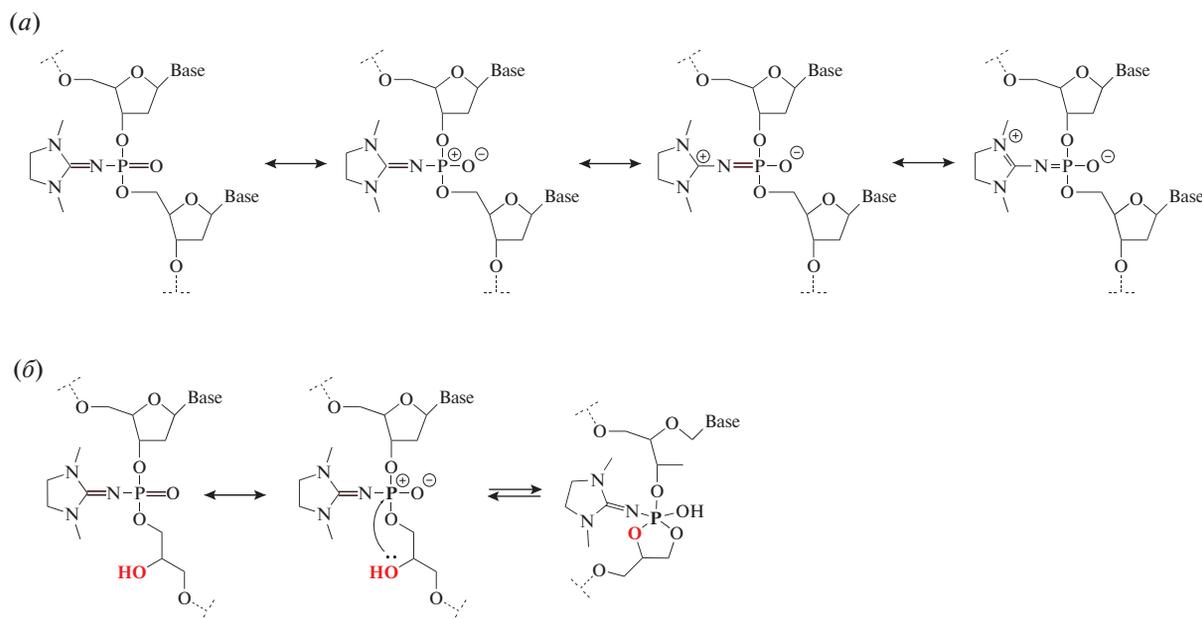


Рис. 4. (а) – Резонансные структуры, возможные для ФГ-звена, расположенного в межнуклеозидной позиции; (б) – схема внутримолекулярного образования циклического эфира фосфорной кислоты.

ном положении в целом является электронейтральной после проведения деблокирования ON, но в то же время вероятно, что в ФГ-группе может реализовываться распределение электронной плотности согласно резонансным структурам, приведенным на рис. 4а.

Остаток DMI в данной схеме может выступать в роли донора электронов по мезомерному эффекту, стабилизируя положительный заряд, возникший на атоме фосфора в результате поляризации двойной связи P=O. Таким образом, возможно, что в ФГ-группе двойная связь P=O ионизована в большей степени, чем в составе немодифицированной фосфатной группы. В том случае, когда ФГ-группа находится вблизи нуклеотидного звена (рис. 4б), становится возможной внутримолекулярная атака свободной гидроксигруппы, входящей в состав линкера, по атому фосфора. Это может привести к образованию циклического эфира фосфорной кислоты, который в дальнейшем может деградировать с расщеплением одной из связей P–O или P–N, что и привело бы к утере либо остатка DMI, либо нуклеотидного звена. Аналогичный эффект гидролиза связей P–O или P–N при реализации анхимерного эффекта карбоксильной и гидроксигрупп описан в работах [15, 16].

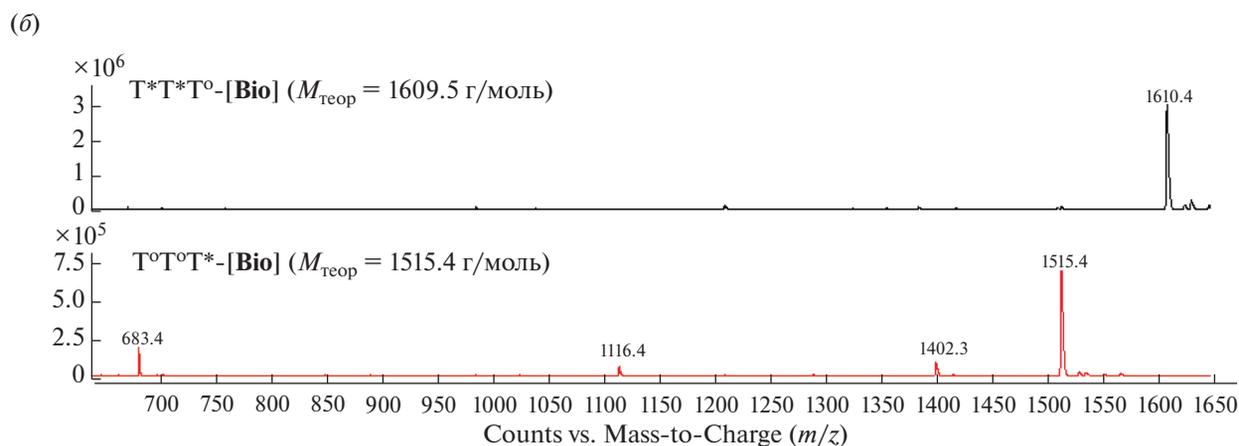
Для проверки этой гипотезы мы синтезировали модельные гомо- и гетеротринуклеотиды, содержащие 3'-концевое нуклеотидное звено и остатки DMI в различных позициях (рис. 5а). Все указанные тринуклеотиды были получены с использованием стандартного автоматического фосфитамидного метода синтеза олигонуклеотидов,

обработаны концентрированным раствором аммиака (2 ч, 56°C), и каждая реакционная смесь (без предварительного разделения компонентов реакционной смеси) была проанализирована методом масс-спектрометрии.

На примере гомотимидилатных олигонуклеотидов T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>T<sup>0</sup>-[Bio] и T<sup>0</sup>T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>-[Bio] рассмотрим результаты масс-спектрометрического анализа в режиме детектирования анионов (рис. 5б). Для данных производных тритимидилатов возможны только две зарядовые формы ( $z = -1$  или  $-2$ ), поскольку структуры содержат лишь одну или две фосфатные группы, способные нести отрицательный заряд. В случае, когда остатки DMI находятся только между нуклеотидными звеньями, в профиле масс-спектра наблюдается пик, соответствующий полноразмерному продукту синтеза T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>T<sup>0</sup>-[Bio]. Других значений  $m/z$ , свидетельствующих о деградации целевого продукта, в спектре не наблюдали.

Во втором случае, когда ФГ-группа находится на 3'-конце рядом с нуклеотидной вставкой, в полученном масс-спектре присутствует как пик, соответствующий целевому продукту T<sup>0</sup>T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>-[Bio] ( $m/z$  1515.4,  $z = -1$ ), так и другие пики с меньшими значениями  $m/z$ . Ни один из них не является второй зарядовой формой целевого продукта с  $z = -2$ , поскольку в этом случае отношение  $m/z$  имело бы значение  $\sim 756.7$ . Следовательно, другие пики также соответствуют зарядовому числу  $z = -1$ , но с меньшей молекулярной массой, т.е. снова наблюдается деградация целевого продукта.

| (a) Последовательность (5'→3')                        | $M_{\text{теор}}$ , Г/МОЛЬ |
|---|----------------------------|
| T* <sup>o</sup> T* <sup>o</sup> T <sup>o</sup> -[Bio] | 1609.5                     |
| T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T*-[Bio]                | 1515.4                     |
| C <sup>o</sup> A* <sup>o</sup> T <sup>o</sup> -[Bio]  | 1509.4                     |
| C <sup>o</sup> A <sup>o</sup> T*-[Bio]                | 1509.4                     |



**Рис. 5.** (a) – Последовательности и теоретические молекулярные массы модельных биотиновых гомо- и гетеротринуклеотидов с различным расположением ФГ-звена; (б) – результаты анализа биотиновых тритимидилатов T\*<sup>o</sup>T\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio] методом ESI MS.

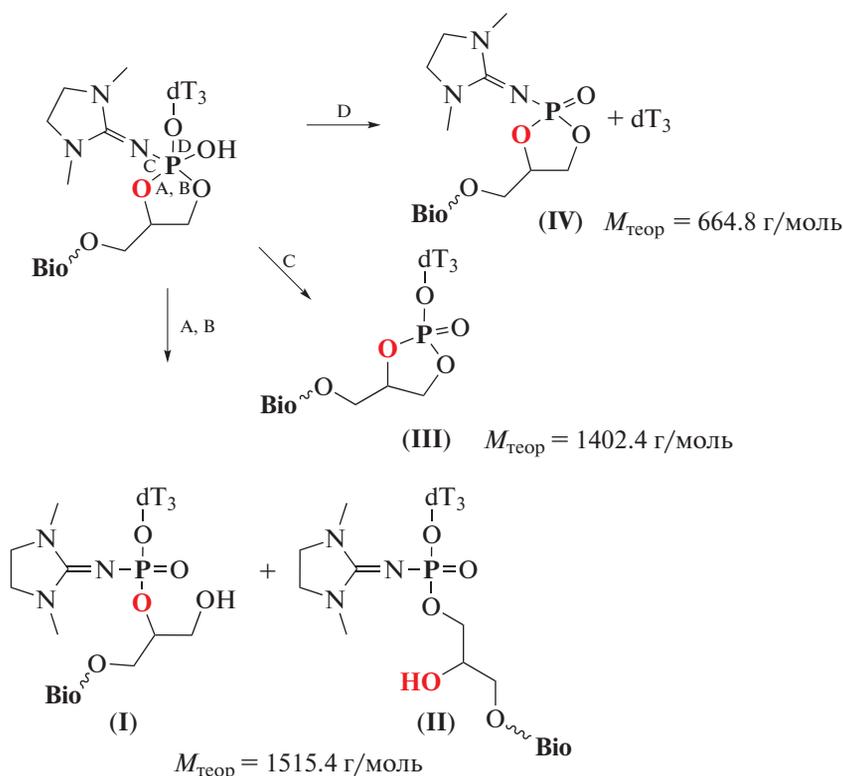
Согласно описанной выше гипотезе, тринуклеотид T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio] мог бы образовать циклический эфир фосфорной кислоты. В процессе обработки концентрированным водным раствором аммиака возможен разрыв одной из связей P–O или P–N. На рис. 6 приведены возможные продукты деградации в зависимости от того, какая связь была разорвана (пути А, В, С, D). Также на рис. 6 указаны теоретические молекулярные массы биотин-содержащих продуктов распада.

Весьма вероятно, что образующиеся по пути С или D циклические триэфир (III) и фосфорилгуанидин (IV) могут быть также гидролизованы с образованием ациклических форм, что следует учитывать при анализе масс-спектров.

Так, помимо пика, соответствующего целевому продукту (II) (или его изомерной форме (I), образующейся в соответствии со схемой по пути В), наблюдается пик со значением  $m/z$  1402.3 (рис. 5б). Данное значение может соответствовать циклическому фосфату (III), образовавшемуся по пути С вследствие разрыва связи P–N и утери остатка DM1. Также в полученном спектре было обнаружено значение  $m/z$  683.4, что может соответствовать образованному в случае распада по пути D продукту (IV) в ациклической форме.

Таким образом, основываясь на данных масс-спектрометрического анализа реакционных смесей, полученных в результате синтеза T\*<sup>o</sup>T\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio], можно утверждать, что непосредственная близость ФГ-группы и нуклеотидного звена, содержащего свободную гидроксигруппу в составе этиленгликолевого линкера, приводит к деструкции целевого продукта синтеза T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio]. Значения масс, найденные для продуктов распада целевого ON, не противоречат предложенной схеме, основанной на внутримолекулярном образовании циклического эфира фосфорной кислоты при участии прилегающей гидроксигруппы нуклеотидного звена. Для гетеротринуклеотидов C<sup>o</sup>A\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и C<sup>o</sup>A<sup>o</sup>T\*-[Bio] результаты анализа ESI MS ничем принципиально не отличались: деструкция наблюдалась только тогда, когда возможна внутримолекулярная нуклеофильная атака гидроксигруппы по ФГ-группе (с образованием пятичленного цикла).

На примере тринуклеотидов C<sup>o</sup>A\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и C<sup>o</sup>A<sup>o</sup>T\*-[Bio], содержащих одну ФГ-группу, дополнительно рассматривали различные условия деблокирования (удаления с полимерного носителя) при 56°C, варьируя время (2 ч или ночь) об-



**Рис. 6.** Схема деструкции циклического эфира фосфорной кислоты с разрывом одной из связей А, В, С, D. Приведены теоретические молекулярные массы биотин-содержащих продуктов (I–IV).

работки концентрированным раствором аммиака. Кроме того, опробовали подход, предложенный в работе Vazhenov et al. [12]: последовательно обрабатывали ON безводным 50%-ным раствором триэтиламина в ацетонитриле (1 ч, 56°C), после чего удаляли триэтиламин и обрабатывали ON раствором аммиака (2 ч, 56°C). Такой подход позволяет провести селективное β-элиминирование цианэтильной защитной группы, не удаляя олигонуклеотид с полимерного носителя CPG, что, согласно данным работы Vazhenov et al. [12], “стабилизирует” ФГ-группу при дальнейшей обработке аммиаком. Все реакционные смеси анализировали методом ОФХ (рис. 7).

Видно, что олигонуклеотид C°A\*Г°-[Bio], в котором ФГ-группа расположена между нуклеотидными звеньями, практически не содержит побочных продуктов: на профиле хроматограммы присутствует один выраженный пик, время удерживания ~7.8 мин (рис. 7а). Профили хроматограмм идентичны как в случае двухчасовой обработки олигонуклеотида аммиаком, так и в случае обработки в течение ночи (рис. 7б). Таким образом, деблокирование C°A\*Г°-[Bio] происходит без деструкции целевого продукта, как и ожидалось согласно предложенной схеме (рис. 4).

В случае C°A\*Г\*-[Bio] после 2-часовой обработки аммиаком на хроматограмме наблюдаются три

сопоставимых по величине пика (рис. 7в). Один из них также имеет время удерживания ~7.9 мин, что соответствует полноразмерному продукту синтеза, остальные обладают меньшим временем удерживания. В случае последовательной обработки безводным раствором триэтиламина (для удаления β-цианэтильной защитной группы [12]) и затем аммиаком профиль хроматограммы в целом не изменялся (данные не приведены). Длительная обработка C°A\*Г\*-[Bio] аммиаком приводила к почти полному исчезновению пика на 7.9 мин (рис. 7г). Вероятно, это свидетельствует о том, что само по себе наличие остатка DMI возле атома фосфора благоприятствует внутримолекулярной нуклеофильной атаке гидроксигруппы, и дальнейшая деградация циклического эфира происходит необратимо, не приходя к равновесному состоянию. Данный факт накладывает ограничение на химические структуры, в состав которых возможно ввести остаток DMI: непосредственная близость ФГ-группы и заместителей, обладающих нуклеофильными свойствами, может привести к деградации целевого продукта. Например, весьма вероятно, что деградация будет происходить в случае синтеза ФГ-РНК, поскольку 2'-гидроксигруппа рибозы также может атаковать по межнуклеотидному атому фосфора, и введение

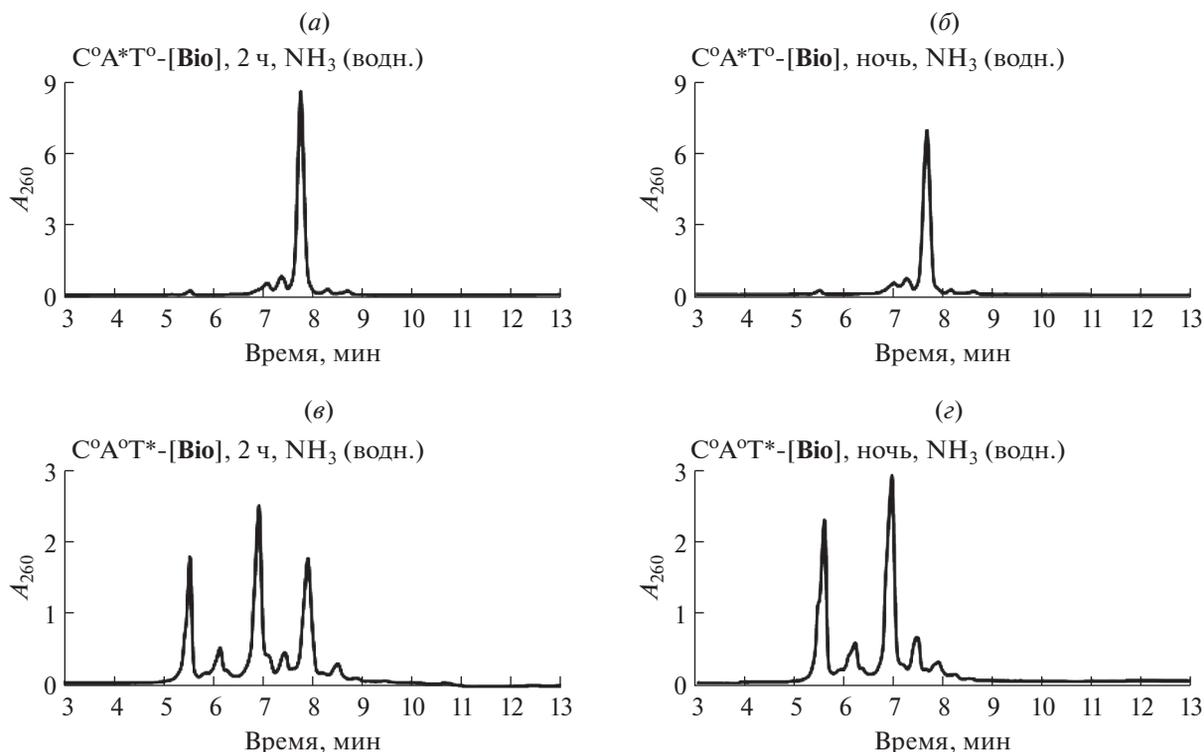


Рис. 7. Профили ОФХ, полученные в результате обработки гетеротринуклеотидов  $C^{\circ}A^{\circ}T^{\circ}$ -[Bio] и  $C^{\circ}A^{\circ}T^*$ -[Bio] водным раствором аммиака в течение 2 ч (а, в) или ночи (б, г) при  $56^{\circ}C$ .

остатков DMI, по-видимому, будет провоцировать этот процесс.

Таким образом, на примере модельных тринуклеотидов было получено экспериментальное подтверждение того, что непосредственная близость ФГ-группы и нуклеофильных заместителей в структуре олигонуклеотида приводит к разрушению целевого продукта в стандартных условиях деблокирования (обработки водным раствором аммиака). Для точного подтверждения механизма требуются дополнительные эксперименты, поскольку использованные в данной работе методы — масс-спектрометрия и ОФХ — не позволяют судить о конкретных структурных преобразованиях внутри молекулы. Тем не менее, имеющиеся экспериментальные данные согласованно и воспроизводимо указывают на нестабильность ФГ-звена в том случае, если возможна внутримолекулярная нуклеофильная атака по атому фосфора, и подтверждают анхимерное содействие ОН-группы. Эту особенность необходимо учитывать на стадии дизайна функциональных ON, содержащих остатки DMI в своей структуре, поскольку для 2'-ОМе ФГ-содержащего 26-звенного биотинилированного олигонуклеотида, содержащего такой же этиленгликолевый линкер в составе ненуклеотидного звена, все описанные выше эффекты сохранялись (данные не приведены).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

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

**Синтез олигонуклеотидов.** Синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе ASM800 (Биоссет, Россия) согласно стандартному протоколу 2-цианэтильного фосфитамидного метода, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и биотин-содержащее пористое стекло (Biotin CPG; Primetech, Республика Беларусь). Олигонуклеотиды, содержащие ФГ-звенья, синтезировали, используя протокол, описанный нами ранее [8, 13].

**Деблокирование олигонуклеотидов.** 26-Звенные биотиновые олигонуклеотиды удаляли с полимерного носителя, обрабатывая полимер концентрированным водным раствором аммиака в течение

ночи при нагревании до 56°C. Для модельных биотиновых тритимидилатов обработку проводили в течение 2 ч при нагревании до 56°C. Гетеротринуклеотиды (С<sup>о</sup>А\*Т<sup>о</sup>-[Bio] и С<sup>о</sup>А\*Т\*-[Bio]) обрабатывали в течение 2 ч при 56°C, затем (если необходимо) выдерживали в концентрированном водном аммиаке в течение ночи. В независимом эксперименте тринуклеотид С<sup>о</sup>А\*Т\*-[Bio] обрабатывали сначала безводным раствором 50%-ного триэтиламина в ацетонитриле (1 ч, 56°C), затем удаляли раствор триэтиламина и обрабатывали С<sup>о</sup>А\*Т\*-[Bio] водным раствором аммиака (2 ч, 56°C).

**Хроматография.** Препаративное выделение (DMTr-on) 26-звенных биотиновых олигонуклеотидов осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ) на хроматографе Agilent 1200 (Agilent, США). Использовали колонку (4.6 × 150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм; Agilent, США), элюировали в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–90%) в 0.02 М растворе триэтиламмоний ацетата за 40 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

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

**Масс-спектрометрия.** Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли методом ESI MS на приборе Agilent G6410A LCMS/MS (Agilent, США). Для анализа олигонуклеотидов образцы растворяли в 20 мМ триэтиламмоний ацетате в 60%-ном водном ацетонитриле (до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл). Анализ проводили с использованием 80%-ного водного ацетонитрила в качестве элюента при скорости потока 0.1 мл/мин в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Для анализа ФГО образец растворяли в 20 мМ муравьиной кислоте в 60%-ном водном ацетонитриле (до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл), анализ проводили в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

**Гель-электрофорез.** Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях проводили в 15%-ном ПААГ, содержавшем SDS (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид (29 : 1), 5 М мочевины, 0.05% SDS), в буфере TBE-SDS (89 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 0.05% SDS) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклео-

тидных образцов в гель использовали раствор, содержащий 5 М мочевины, 0.025%-ный ксиленианол и 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.05% SDS. Результаты электрофоретического разделения визуализировали, помещая гель на флуорофор-содержащую пластинку TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, США) и облучая УФ-светом (265 нм). Олигонуклеотидный материал проявляется в виде “теней” на фоне флуоресцирующей подложки.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа по анализу механизма реализации анхимерного эффекта выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-90132) и является развитием пилотных исследований по масс-спектрометрическому анализу, проведенных при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00357) в 2019 г.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Glazier D.A., Liao J., Roberts B.L., Li X., Yang K., Stevens C.M., Tang W.* // *Bioconjugate Chem.* 2020. V. 31. P. 1213–1233.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00060>
2. *Bennett C.F.* // *Annu. Rev. Med.* 2019. V. 70. P. 307–321.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829>
3. *Eckstein F.* // *Nucleic Acid Ther.* 2014. V. 24. P. 374–387.  
<https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>
4. *Rettig G.R., Behlke M.A.* // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. P. 483–512.  
<https://doi.org/10.1038/mt.2011.263>
5. *Braasch D.A., Corey D.R.* // *Chem. Biol.* 2001. V. 8. P. 1–7.  
[https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00058-2)
6. *Nielsen P.E.* // *Chem. Biodivers.* 2010. V. 7. P. 786–804.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201000005>
7. *Du L., Gatti R.A.* // *J. Immunol. Methods.* 2011. V. 365. P. 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.12.001>
8. *Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A.* // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. P. 116–118.
9. *Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 709–718.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060153>

10. *Pyshnaya I.A., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 677–683.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060335>
11. *Kor K., Turner A., Zarei K., Atabati M., Beni V., Mak W.C.* // Anal. Bioanal. Chem. 2016. V. 408. P. 1475–1485.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9250-9>
12. *Bazhenov M.A., Shernyukov A.V., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 699–708.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060074>
13. *Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // Patent WO2016028187A1, 2016.
14. *Pavlova A.S., Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Amirkhanov N.V., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A.* // Electrophoresis. 2018. V. 39. P. 670–674.  
<https://doi.org/10.1002/elps.201700415>
15. *Maiti M., Michielssens S., Dyubankova N., Maiti M., Lescrinier E., Ceulemans A., Herdewijn P.* // Chemistry. 2012. V. 18. P. 857–868.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201102279>
16. *Kupryushkin M.S., Konevets D.A., Vasilyeva S.V., Kuznetsova A.S., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2013. V. 32. P. 306–319.  
<https://doi.org/10.1080/15257770.2013.787147>

## Problems of Synthesis of Oligonucleotide Derivatives in the Realization of Anchimeric Assistance

**E. S. Dyudeeva\*, A. S. Pavlova\*, M. S. Kupryushkin\*, D. V. Pyshnyi\*, \*\*, and I. A. Pyshnaya\*,#**

\*Phone: +7 (383) 363-51-35; e-mail: [pyshnaya@niboch.nsc.ru](mailto:pyshnaya@niboch.nsc.ru)

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

\*\*Novosibirsk State University, Department of Natural Sciences, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

It was found that the presence of a free OH group on the 3'-terminal residue of the substituted ethylene glycol fragment in the phosphorylguanidine oligodeoxyribonucleotide is a factor that determines the instability of the structure of the target oligonucleotide product under the conditions of a standard deblocking protocol. It has been shown that the main by-products of the realization of such an anchimeric effect of the OH group are the products of the transesterification reaction of the phosphorylguanidine (PG) unit carrying the *O*-substituted ethylene glycol residue. Mass-spectrometric analysis data show that under alkaline conditions, there is an accumulation of derivatives lacking the *N,N,N',N'*-substituted guanidine residue (1,3-dimethylimidazolidine-2-imine or DMI), or only 3'-terminal PG-containing non-nucleotide unit.

*Keywords: modified oligonucleotides, phosphorylguanidines, mass spectrometry, anchimeric effect*