

УДК 547.96332.057:542.95

ГИБРИДАЗНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК*. ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗОНДЫ С ВКЛЮЧЕНИЯМИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПРИ С2'-АТОМЕ АМИНО- ИЛИ ГИДРОКСИЛЬНУЮ ГРУППУ

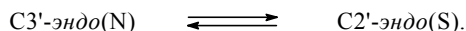
Е. М. Зубин, Н. Ф. Крынецкая, Е. А. Романова**, Т. С. Орецкая***

(кафедра химии природных соединений)

Исследована способность олигодезоксирибонуклеотидов с включениями 2'-амино-2'-дезоксипиримидиновых нуклеозидов, 2'-амино-2'-дезоксикарабиноаденозина, рибонуклеозидов и арабиноуридина образовывать дуплексы с комплементарными ДНК-матрицами. Изучены субстратные свойства гибридных дуплексов, образованных 5S РНК рибосом *E. coli* и синтезированными олигодезоксирибонуклеотидными зондами, по отношению к РНКазе Н из *E. coli*.

Комплексное решение проблем антисенсовой биотехнологии подразумевает получение такого олигонуклеотида, который проникал бы в клетку, существовал в ней определенное время, не будучи при этом токсичным, и образовывал устойчивый комплекс с НК-мишенью [1]. При конструировании такого модифицированного олигонуклеотидного зонда большое значение имеет способность образующегося модифицированного ДНК-РНК-дуплекса выступать эффективным субстратом РНКазы Н. При этом фермент расщепляет РНК в составе гетеродуплекса [2].

В литературе [3] подчеркивается уникальная роль заместителя при С2'-атоме углеводного фрагмента нуклеиновых кислот. Его природа непосредственно влияет на конформационное равновесие



Этот факт обуславливает появление многочисленных исследований свойств нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих различные заместители в этом положении.

Ранее было показано, что использование олигодезоксирибонуклеотидных зондов с включениями 2'-О-метилрибо- [4], 2'-фтор- [5] или рибонуклеозидов [6] позволяет провести региоспецифическое гибридазное расщепление РНК РНКазой Н.

Модифицированные нуклеозиды, включенные в состав олигонуклеотидов, изменяли физико-химические и субстратные свойства последних. В настоящее время актуальной задачей является получение одно- и двутяжевых ДНК, содержащих в своем составе группировки, реакционная способность которых отличалась бы от реакционной способности функциональных групп природной ДНК. В рам-

ках этого направления нами был осуществлен синтез олигонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксипиримидиновые звенья [7], а также 2'-амино-2'-дезоксикарабиноаденозин [8]. Такие зонды могут быть использованы в антисенсовой терапии, поскольку они устойчивы к действию клеточных нуклеаз, а 2'-аминогруппа в составе олигонуклеотидов проявляет высокую реакционную способность в реакциях с электрофильными реагентами [7, 8]. Это позволит в дальнейшем ковалентно присоединять к олигонуклеотидам молекулы, облегчающие проникновение зондов через клеточную мембрану [9].

Настоящая работа является продолжением серии исследований, проводимых в нашей лаборатории, по поиску оптимальной структуры олигонуклеотидного зонда. Ее цель – изучение и последующее сравнение комплементарных свойств олигодезоксирибонуклеотидов, имеющих в своем составе модифицированные нуклеозиды, при С2'-атоме которых содержится гидроксильная или аминогруппа (схема), а также исследование характера взаимодействия образованных ими и фрагментами 5S РНК двуспиральных комплексов с РНКазой Н. Особое внимание при этом уделялось тому, в какой степени конфигурация заместителей при С2'-атоме влияет на термическую стабильность полученных НК-дуплексов, выступающих в роли субстратов бактериальной РНКазы Н.

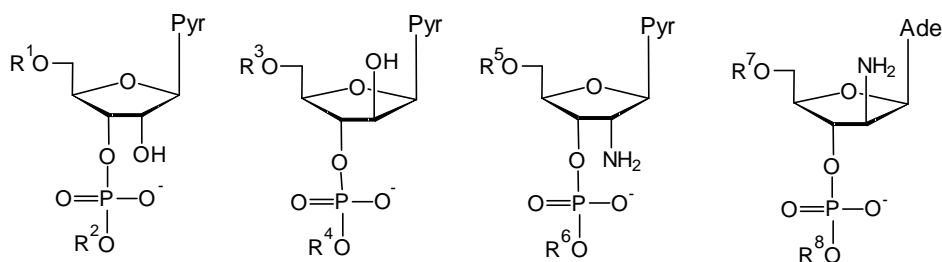
При изучении субстратной специфичности модифицированных гибридных дуплексов была использована РНКазы Н из *E. coli*, поскольку она является одним из наиболее изученных ферментов этого класса и имеет большой процент гомологии с РНКазой Н человека и вирусов [10]. Исследование проводили на модельных гетеродуп-

* Под гибридазным расщеплением подразумевается катализируемый РНКазой Н (гибридазой) гидролиз РНК в составе гибридного дуплекса с комплементарным олигодезоксирибонуклеотидом. Префикс «д» (дезоксид) при обозначении нуклеозидов и олигонуклеотидов 2'-дезоксиряды опущен.

** НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского.

*** Тел.: (095) 939-3148; Fax: (095) 939-3181; E-mail: oretskaya@synton.genebee.msu.ru

Схема



Pyr = Cyt или Ura,

R¹-R⁸ – фрагменты олигонуклеотидных цепей

лексах, образованных фрагментами 5S РНК *E. coli* и модифицированных олигонуклеотидами, структуры которых представлены в табл. 1.

Олигонуклеотиды IV, V и XIII содержат вставки 2'-амино-2'-деоксирибоцитидина (Cⁿ), 2'-амино-2'-деоксиарабиноаденозина (aAⁿ) и 2'-амино-2'-деоксирибоуридина

(Uⁿ) соответственно. Нуклеотидные последовательности олигомеров (III), (VIII), (IX), и (XII) с включениями цитидина (rC), уридина (rU) и арабиноуридина (aU) были выбраны с целью дальнейшего корректного сравнения свойств модифицированных ДНК-ДНК- и ДНК-РНК-дуплексов различных типов. Синтез модифицированных олигонуклеотидов описан нами ранее [7, 8, 11, 12].

На первом этапе работы необходимо было оценить, каким образом модифицированные звенья, находящиеся в одной из цепей, влияют на термическую устойчивость ДНК-дуплексов, и определить температурный режим проведения реакции ферментативного гидролиза. Следует подчеркнуть, что оценка термической стабильности модельных ДНК-дуплексов имеет большое значение, так как ранее было показано, что гибридазное расщепление протекает неэффективно, если образуется слабый комплекс между олигодезоксирибонуклеотидным зондом и РНК-мишенью [13].

Из данных табл. 1 видно, что включение в олигомерную цепь рибонуклеозидов не изменяет температуру плавления соответствующих НК-дуплексов В и F. Напротив, вставка арабиноуридина в одной из комплементарных цепей ДНК-дуплексов G и J обуславливает существенное понижение температуры плавления (на 15 и 40° С соответственно).

Было обнаружено, что наличие 2'-аминоарабиноаденозина в составе олигонуклеотида приводит к некоторому понижению температуры плавления ДНК-дуплекса по сравнению с немодифицированным аналогом. Так, температура плавления дуплекса D (57° С) оказалась на 6° ниже температуры плавления соответствующего немодифицированного дуплекса А. Сравнение влияния 2'-амино-2'-деоксицитидина и 2'-аминоарабиноаденозина на термическую устойчивость ДНК-дуплекса показало, что последний вносит меньшие искажения в структуру ДНК-дуплекса: температура плавления дуплекса С той же первичной структуры, но с 2'-амино-2'-деоксицитидиновыми вставками оказалась на 10° ниже температуры плавления немодифицированного дуплекса А.

Т а б л и ц а 1

Термическая стабильность модифицированных ДНК-дуплексов

Шифр	ДНК-дуплекс 5' → 3' 3' ← 5'	T _{пл} , °C (-1)
A	I ACCACCGCGCT	63
	II CCTGGTGGCGGAGTG	
B	III ACCACrCGCGrCT	65
	II CCTGGTG GCGC GAGTG	
C	IV ACCAC ⁿ CGCGC ⁿ T	53
	II CCTGGTG GCGCG AGTG	
D	V GaA ⁿ CCaA ⁿ CCGCGCT	57
	II CC T GG T GCGCGAGTG	
E	VI CTACTCTCGC	50
	VII GGATGAGAGCGT	
F	VIII CTACrUCrUCGC	50
	VII GGATG AG AGCGT	
G	IX CTACaUaUCGC	35
	VII GGATG AG AGCGT	
H	X CACTTCTGAG	48
	XI AGTGAAGACTCA	
J	XII CACaUaUCTGAG	<10
	XI AGTG A AGACTCA	
K	XIII CACTU ⁿ CU ⁿ GAG	<10
	XI AGTGAA GA CTCA	

Таблица 2

Эффективность гидролиза гетеродуплекса РНКазой H

Шифр		ДНК – РНК-дуплекс 5' → 3' 3' ← 5'	Относительная степень гидролиза РНК, %
a	I	ACCACCGCGCT ... ₂₅ UGGUGGCGCGA ₁₅ ...	100
b	III	ACCACrCGCGrCT ... ₂₅ UGGUG GCGC GA ₁₅ ...	100
c	IV	ACCAC ⁿ CGCGC ⁿ T ... ₂₅ UGGUG GCGCG A ₁₅ ...	98
d	V	GaA ⁿ CcAa ⁿ CGCGCT ... ₂₅ U GG U GCGCGA ₁₅ ...	90
e	VI	CTACTCTCGC ... ₁₀₅ GAUGAGAGCG ₉₆ ...	100
f	VIII	CTACrUCrUCGC ... ₁₀₅ GAUG AG AGCG ₉₆ ...	100
g	IX	CTACaUcAUCGC ... ₁₀₅ GAUG AG AGCG ₉₆ ...	90
h	X	CACTTCTGAG ... ₅₆ GUGAAGACUC ₄₇ ...	100
j	XII	CACaUaUCTGAG ... ₅₆ GUG A AGACUC ₄₇ ...	30
k	XIII	CACU ⁿ CU ⁿ GAG ... ₅₆ GUGAA GA CUC ₄₇ ...	20

Дестабилизирующий эффект в каждом конкретном случае зависит не только от типа модификации, но и от нуклеотидного состава зондов и их длины. Искажение вторичной структуры фрагментов ДНК может нивелироваться при условии их богатого G-C-состава. Например, температура плавления ДНК-дуплекса С выше температуры плавления дуплекса К более чем на 40° при том, что оба дуплекса содержат в своем составе 2'-амино-2'-дезоксинуклеозиды.

Обобщая полученные данные, с большой степенью уверенности можно утверждать: четкой аналогии в гибридизационных свойствах олигонуклеотидов, содержащих, с одной стороны, рибонуклеозиды и арабинонуклеозиды, а с другой – 2'-амино-2'-дезоксирибо- и 2'-амино-2'-дезоксисарабинонуклеозиды, не прослеживается. Если в случае 2'-гидроксильной группы изменение *цис*-ориентации относительно связи С1'– N на *транс*-ориентацию приводит к понижению термической устойчивости соответствующих ДНК-дуплексов, то в случае аминокруппы наблюдается обратная картина. Причем интересно то, что углеводный фрагмент 2'-амино-2'-дезоксирибидина имеет С2'-эндо-кон-

формацию (S-тип) [14], т. е. дестабилизирующий эффект данной модификации не связан с конформацией сахарного остатка, так как в В-форме ДНК углеводные фрагменты имеют как раз С2'-эндо-конформацию. Тот же тип конформации, по всей вероятности, имеет углеводный остаток 2'-амино-2'-дезоксисарабиноаденозина, когда последний находится в составе олигонуклеотида. Этот вывод был сделан на основе аналогии с арабинонуклеозидами: для раА – С3'-эндо-конформация (N-тип), для аАр – S-тип, а для аАраАраА – S-S-N [15].

По всей видимости, природа дестабилизирующего влияния арабино- и 2'-аминонуклеозидов на структуру двойной спирали и различный характер этого влияния для каждого типа модификации могут быть связаны с разной организацией пространственной структуры пар оснований, одно из которых связано с модифицированным углеводным фрагментом. Следует также учитывать, насколько локально данное нарушение двойной спирали. В какой-то степени эти предположения подтверждаются исследованиями межплоскостных взаимодействий гетероциклических оснований (стэкинг-взаимодействий) в динуклеозидфосфатах, содержащих арабиноуридин [16], 2'-амино-2'-дезоксирибоуридин [7], 2'-амино-2'-дезоксисарабиноаденозин [8].

Все синтезированные олигонуклеотидные зонды I – X были использованы в комплексе с 5S РНК рибосом *E. coli* как субстраты бактериальной РНКазы H. Олигонуклеотиды формируют гибридные дуплексы (табл. 2) с фрагментами 15 – 25 (дуплексы а – d); 96 – 105 (дуплексы е – g) и 47 – 56 (дуплексы h – k) в 5S РНК рибосом *E. coli*.

Как видно из рис. 1 и 2, использование, например, немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидных зондов I и VI приводит к множественному гидролизу РНК. Аналогичные результаты наблюдались для олигонуклеотидов IV и V, содержащих 2'-аминонуклеозиды (рис. 1). Эти данные подтверждают тот факт, что углеводные фрагменты 2'-аминонуклеозидов находятся в С2'-эндо-конформации. В случае применения зонда VIII происходит повышение селективности расщепления – гидролизуются только две фосфодиэфирные связи (рис. 2), что связано с введением в состав олигонуклеотида рибозвеньев.

Однако эффективность ферментативного гидролиза для ДНК – РНК-дуплексов, образованных разными зондами, различна (табл. 2). Использование олигонуклеотидов IV и V приводит к незначительному снижению эффективности гидролиза по сравнению с их немодифицированным аналогом I и зондом III.

Анализируя данные табл. 2, можно сделать вывод, что снижение эффективности гидролиза РНК происходит в присутствии зондов, образующих непрочный ДНК-дуплекс. Эффективность гидролиза гетеродуплексов j и k снижается до 30 и 20% соответственно. Если же использо-

они образуют устойчивый комплекс с НК-мишенью, не препятствуют функционированию РНКазы Н и поэтому могут быть успешно применены при конструировании антисенсовых олигонуклеотидов.

Материалы и методы

В работе использовали MES, MgCl₂, NaCl, дитиотреит («Merck», Германия), EDTA, LiClO₄ («Fluka», Швейцария), 5S РНК рибосом *E. coli*, акриламид, бисакриламид, трис («Sigma», США), полинуклеотидкиназу фага Т4 («Сибэззим», Россия).

Необходимые для работы олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы амидофосфитным методом на авто-



Рис. 1. Радиоавтограф разделения в 20% ПААГ продуктов гидролиза 5'-[³²P]-меченого 1–41 фрагмента 5S РНК, катализируемого РНКазой Н в присутствии олигонуклеотидов: I – дорожка 2, IV – дорожка 3, V – дорожка 4, исходная РНК – дорожка 1. Время инкубации 10 мин. Справа отмечено положение красителей-маркеров: ксиленианола (ХС) и бромфенолового синего (ВрВ)

вать олигонуклеотиды IV и IX с включениями 2'-амино-2'-дезоксирибоуридина и арабиноуридина, образующие более прочные комплексы с НК-мишенью, то эффективность гидролиза возрастает соответственно до 98 и 90%.

Полученные закономерности необходимо учитывать при конструировании олигонуклеотидных зондов для направленного гидролиза РНК. Сравнение свойств олигонуклеотидных зондов различных типов показало, что использование олигомеров с включениями 2'-амино-2'-дезоксинуклеозидов, в отличие от олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих рибо-звенья, не обеспечивает сокращение числа гидролизуемых связей в РНК. С другой стороны, при условии достаточно богатого G·C-состава

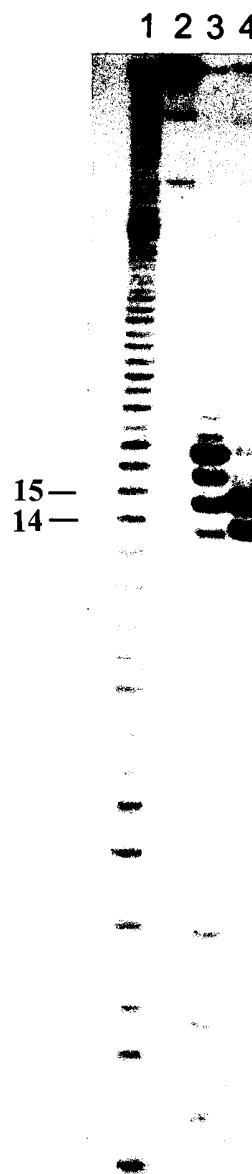


Рис. 2. Радиоавтограф разделения в 20% ПААГ продуктов гидролиза 3'-[³²P]-меченой 58 РНК рибосом *E. coli*, катализируемого РНКазой Н в присутствии олигонуклеотидов: щелочной гидролиз 3'-[³²P]РНК – дорожка 1; исходная РНК – дорожка 2; VI – дорожка 3; VIII – дорожка 4. Время инкубации 60 мин. Стрелками отмечена длина олигонуклеотидных фрагментов

матическом синтезаторе «Applied Biosystems 380В» (США) с использованием коммерческих реагентов и растворителей. Температурную зависимость УФ-поглощения дуплексов измеряли на спектрофотометре «Hitachi Model 150-20» (Япония) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5 град/мин в термостатируемых кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм. Концентрация дуплексов составляла $0.3 \cdot 10^{-4}$ М.

Препарат РНКазы Н (КФ 3.1.26.4) из *E. coli* с молекулярным весом 17.6 кДа, содержащий 4.05 мг/мл белка, был любезно предоставлен С. Канае (Институт инженерии белка, Осака, Япония).

Радиоактивную метку вводили в 5'-конец РНК с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, в 3'-конец с помощью Т4 РНК-лигазы в присутствии $[\text{}^{32}\text{P}]\text{рСр}$. Растворы ДНК–ДНК- и РНК–ДНК-дуплексов готовили смешением эквимольных количеств соответствующих олигонуклеотидов. Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, исходя из молярных коэффициентов поглощения нуклеозидов.

5'-Фосфорилированные гибридные дуплексы с известной удельной радиоактивностью получали добавлением к определенному количеству РНК–ДНК-дуплекса 5'- $[\text{}^{32}\text{P}]$ -олигорибонуклеотида, затем проводили отжиг.

Гидролиз РНКазой Н (концентрация $3 \cdot 10^{-7}$ М) 5'- $[\text{}^{32}\text{P}]$ или 3'- $[\text{}^{32}\text{P}]$ РНК (концентрация $0.5 \cdot 10^{-5}$ М) в присутствии немодифицированных и модифицированных олигонуклеотидов (концентрация $1 \cdot 10^{-4}$ М) проводили в течение 10–60 мин при 20°C в 10 мМ Трис-НСl буфера, рН 7.9, содержащего 0.1 мМ EDTA, 150 мМ NaCl, 0.5 мМ дитиотреит, 10 мМ MgCl_2 [5]. Реакции останавливали, добавляя ацетат натрия, тРНК в качестве соосадителя и 5-кратный объем этанола, а затем выдерживали в течение 4–16 ч при -20°C . Анализ продуктов гидролиза проводили методом электрофореза в 20%-м полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевины, в Трис-боратном буфере (0.05 М Трис-НСl, 0.05 М H_3BO_3 , 1 мМ EDTA, рН 8.3). После проведения автордиографии из геля вырезали зоны, соответствующие исходному материалу и продуктам гидролиза. Их радиоактивность измеряли по Черенкову на счетчике «Delta-300» (Tracor, Нидерланды). Степень гидролиза субстрата определяли как отношение радиоактивности продукта гидролиза к суммарной радиоактивности продукта и нерасщепленного субстрата. Степень гидролиза в присутствии немодифицированного зонда принимали за 100%.

Работу проводили при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (97-04-48624) и программы «Университеты России – фундаментальные исследования» (5-5166).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen J.S. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression L., 1989. P. 1.
2. Donis-Keller H. // Nucl. Acids Res. 1979. 7. P. 179.
3. Wohlrab F., Jamieson A.T., Hay J., Mengel R., Guschlbauer W. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. 824. P. 233.
4. Метелев В.Г., Крынецкая Н.Ф., Пурмаль А.А., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1990. 16. С. 507.
5. Schmidt S., Nieman A., Krynetskaya N.F., Oretskaya T.S., Meteleev V.G., Sukhomlinov V.V., Shabarova Z.A., Cech D. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. 1130. P. 41.
6. Nakai C., Konishi A., Komatsu Y., Inoue H., Ohtsuka E., Kanaya S. // FEBS Lett. 1994. 339. P. 67.
7. Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Таулицкий В.Н., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1993. 19. С. 455.
8. Zubin E.M., Antsyrovich S.I., Oretskaya T.S., Romanova E.A., Volkov E.M., Tashlitsky V.N., Dolinnaya N.G., Shabarova Z.A. // Nucleosides and Nucleotides 1998. 17. P. 425.
9. Uhlmann E., Peyman A. // Chem. Rev. 1990. 90. P. 544.
10. Yang W., Hendricson W.A., Crouch R.J., Satow Y. // Science 1990. 249. P. 1398.
11. Романова Е.А., Орецкая Т.С., Сухомлинов В.В., Крынецкая Н.Ф., Метелев В.Г., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1990. 16. С. 1348.
12. Ибрагим Х.К.Х. // Дис. ... канд. хим. наук. М., 1993.
13. Alexeev Y.I., Krynetskaya N.F., Tashlitsky V.N., Oretskaya T.S., Dolinnaya N.G., Morvan F., Rayner B., Malvy C., Shabarova Z.A. // Nucleosides and Nucleotides 1996. 15. P. 1545.
14. Guschlbauer W., Jankowski K. // Nucl. Acids Res. 1980. 8. P. 1421.
15. Doornfos J., Barascut J.L., Lazrek H., Imbach, J.L., van Westrenen J., Visser M.G., Boom J.H. van, Altona C. // Nucl. Acids Res. 1983. 11. P. 4583.
16. Sokolova N.I., Dolinnaya N.G., Krynetskaya N.F., Shabarova Z.A. // Nucleosides and Nucleotides 1990. 9. P. 515.

Поступила в редакцию 23.04.98