

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова**

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Андреев Сергей Юрьевич

**СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ГИДРОФОБНЫМИ
ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ
ПОВРЕЖДЕНИЙ В ДНК**

02.00.10 - биорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МОСКВА-2005

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и на кафедре биофизики физико-математического факультета университета Братиславы, Словакия.

Научный руководитель:

доктор химических наук,
профессор Орецкая Татьяна Семеновна

Консультант:

проф. Тибор Гианик (Словакия)

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, вед. науч. сотр.
Коршунова Галина Анатольевна

доктор биологических наук, гл. науч. сотр.
Шумянцева Виктория Васильевна

Ведущая организация:

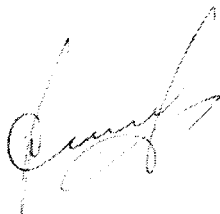
Институт биоорганической химии
им. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится 29 марта 2005 года в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ.

Автореферат разослан 28 февраля 2005 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук**



Смирнова И.Г.

Актуальность проблемы Область исследований, посвященных ДНК и ее роли в биологических процессах, находится в стадии интенсивного развития и требует создания новых, все более совершенных методов генной детекции. Область применения таких методов различна - от диагностики точечных мутаций, связанных с наличием в организме наследственных заболеваний, до выявления ДНК патогенных микроорганизмов, присутствие которых в пищевых продуктах необходимо контролировать. Наиболее часто для определения наличия в исследуемом образце ДНК заданной последовательности используется ее способность к гибридизации с комплементарным фрагментом, иммобилизованным на поверхности сенсора. Существует широкий спектр материалов, используемых при изготовлении сенсоров. Иммобилизация фрагментов ДНК на различных поверхностях с целью создания биосенсоров представляет, таким образом, интенсивно развивающееся и перспективное направление в химии нуклеиновых кислот.

Целью настоящего исследования являлась разработка новых методов детекции нарушений в структуре ДНК-дуплексов с использованием модифицированных олигонуклеотидов. В этой связи требовалось провести синтез и изучение свойств синтетических олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные заместители двух типов - олеиламина в произвольном положении олигонуклеотидной цепи и меркаптододеканола на 5'-конце, которые будут использоваться для нековалентной иммобилизации на гидрофобных поверхностях, а также для ковалентной иммобилизации на золотых электродах. Важная часть работы посвящена демонстрации практического применения синтезированных олигонуклеотидов для детекции ДНК.

Научная новизна и практическая ценность В ходе работы впервые синтезированы олигонуклеотиды, содержащие остатки олеиламина в составе гетероциклических оснований и меркаптододеканола на 5'-конце. Отработаны условия хроматографической очистки продуктов с использованием гидрофобных свойств введенных заместителей. Определена устойчивость модифицированных олигонуклеотидов к нуклеазной деградации, изучена термическая стабильность дуплексов и влияние липосом диолеилфосфатидилхолина на их образование, изучена возможность детекции нарушений в ДНК-дуплексах по изменению термодинамических характеристик липидных монослоев, с которыми связывались модифицированные олигонуклеотиды. С использованием иммобилизации серосодержащих олигонуклеотидов создан прототип электрохимического сенсора для детекции некомплементарных пар оснований в составе ДНК-дуплексов на основе золотых электродов.

Публикации и апробация работы По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ. Результаты настоящего исследования были представлены на международных конференциях "Trends in Nucleic Acid Chemistry" (Москва, ноябрь 2000 г), 7th Ibn Sma International Conference on Pure and Applied Heterocyclic Chemistry, 2000, March, 25-28, Alexandria, Egypt, VII-th International Congress on Bioelectrochemistry and Bioengineering, 2001, Bratislava, Slovakia.

Структура диссертации и объем работы. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, посвященного ДНК-сенсорам на основе углеродных и золотых электродов, детекции гибридизации и структурных дефектов ДНК электрохимическими методами, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (140 ссылок), содержит 40 рисунков, 17 схем, 13 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

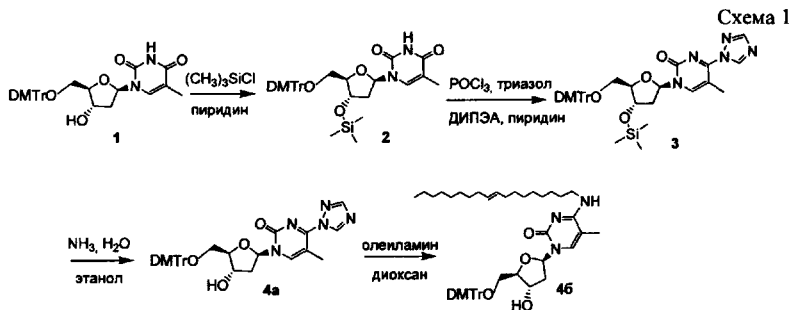
В рамках настоящего исследования нами разработаны методы синтеза модифицированных олигонуклеотидов двух типов - содержащих гидрофобные заместители в С4-положении цитидина для связывания с липидными монослоями и меркаптододецильные линкеры на 5 -конце для иммобилизации на золотых электродах. Поставленная задача включала разработку универсального метода синтеза олигонуклеотидов с остатками олеиламина, предусматривающего возможность модификации любого заданного положения олигонуклеотидной цепи, а также множественных включений гидрофобных остатков в один и тот же олигонуклеотид. Для ковалентной иммобилизации требовалось получить олигонуклеотиды, содержащие гидрофобные линкеры, несущие свободные сульфгидрильные группы. Длина линкеров была обусловлена толщиной гидрофобного монослоя на поверхности электродов, на которых планировалось проводить иммобилизацию олигонуклеотидов. Благодаря линкеру заданной длины олигонуклеотид оказывается максимально экспонированным в раствор, что обеспечивает эффективную гибридизацию с ДНК мишенью и возникновение соответствующего электрического отклика. Для создания монослоя на поверхности электрода использовалась меркаптоундекановая кислота, поэтому в рамках данного исследования требовалась разработка метода синтеза олигонуклеотидов, содержащих на концах алифатические линкеры длиной 12 метиленовых звеньев, несущие свободную или блокированную сульфгидрильную группу.

Необходимым этапом исследования также является изучение физико-химических свойств модифицированных олигонуклеотидов, в частности определение устойчивости модифицированных олигонуклеотидов к нуклеазной деградации; изучение термической стабильности дуплексов и влияния гидрофобных частиц на их образование; исследование влияния таких олигонуклеотидов на термодинамические характеристики липидных монослоев а также создание прототипа электрохимического сенсора для детекции некомплементарных пар оснований в составе ДНК-дуплексов на основе золотых электродов. Конечной целью совместного проекта, в рамках которого выполнена работа, являлось создание электрохимического сенсора для поточного мониторинга ДНК патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Выбор последовательностей олигонуклеотидов определялся их соответствием фрагментам генома патогенной бактерии *Salmonella typhimurium*, присутствие которой в пищевых продуктах может являться причиной острой кишечной инфекции - сальмонеллёза.

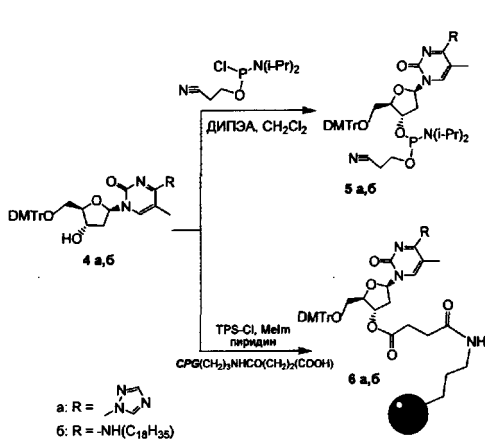
1. Химическая модификация олигонуклеотидов

1.1. Синтез олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина

С целью введения в олигонуклеотиды остатков олеиламина мы использовали метод, предусматривающий активацию остатком триазола С4-положения дезокситимидина [Sang W.L., *J. Org. Chem.*, 47(1982) p. 3623]. С этой целью тимидин, блокированный по 5 -положению диметокситрильной защитной группой (1), вводили в реакцию с триазолом (схема 1). Для исключения реакции по свободной 3 -гидроксильной группе в соединении (1) ее блокировали триметилсилильной защитной группой и вводили остаток триазола по С4-положению соединения (2), используя активацию хлорокисью фосфора(У). После удаления триметилсилильной защитной группы водным аммиаком 1-(5-О-диметокситрилит-2-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-4-(1-триазол)-5-метил-2-пиримидон (4a) вводили в реакцию с олеиламином с образованием 5 -О-ддиметокситрилит-N4-олеил-5-метил-2 -дезокситимидина (4б) (Схема 1).



С целью получения мономерного синтона (56) для олигонуклеотидного синтеза соединение (46) обрабатывали N,N-диизопропиламидо-р-цианэтилхлорфосфитом, а с целью получения олигонуклеотидов, содержащих модификацию на 3-конце, модифицированный нуклеозид (46) иммобилизовали на полимерном носителе (CPG-500) (схема 2).



Амидофосфитное производное (56) вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез, увеличивая время конденсации до 4 минут, а концентрацию (56) - до 0,12 М. Степень превращения на стадии присоединения модифицированного звена составляла не менее 95%.

С использованием соединения (56) и полимерного носителя (66) были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды (I - VIII), содержащие остатки олеиламина (табл. 1).

Таблица 1.

Структура и масс - спектральные характеристики синтезированных олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина

	Первичная структура* (5 → 3)	M _r (MALDI, m/z) расчет/эксп.
I	CACSTTGGCTGAAATTTTCCC*	6267.4/6266.0
II	CAC*STTGGCTGAAATTTTCCC*	6531.9/6529.6
III	C*ACSTTGGCTGAAATTTTCCC*	6531.9/6526.7
IV	CAC*STTGGCTGAAATTTTCCC	6267.4/6265.8
V	C*ACSTTGGCTGAAATTTTCCC	6267.4/6268.4
VI	AC*STTGGCTGAAATTTTCCC*	
VII	AC STTGGCTGAAATTTTCCC*	
VIII	AC*STTGGCTGAAATTTTCCC	

*здесь и далее в таблицах приведены олигодезоксирибонуклеотиды
C*- N'-олеил-5-метил-2-дезоксицитидин

Олигомеры выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства остатка олеиламина. ВЭЖХ-анализ показал, что время удерживания олигонуклеотидов изменялось в полном соответствии с природой и количеством введенных функциональных групп.

1.2. Получение и свойства олигонуклеотидов, содержащих линкерс сульфгидрильной группой на 5-конце.

Мы синтезировали олигонуклеотиды, содержащие присоединенные к 5-фосфатным группам остатки 12-меркаптододеканола-1. Модификацию 5-концевой гидроксильной группы олигонуклеотидов осуществляли в процессе автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза. В общем виде структура олигонуклеотидов, содержащих остатки 12-меркаптододеканола-1, представлена на рис. 2.

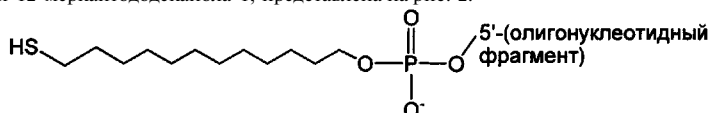
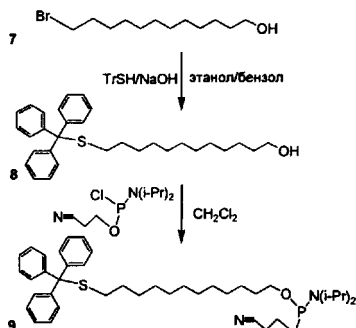


Рис. 2. Олигонуклеотиды, содержащие остатки 12-меркаптододеканола-1.

Синтез 5'-O-(12-меркаптододецил)олигонуклеотидов предусматривает использование N,N-диизопропиламино-β-цианэтил-12-(8-третил)-меркаптододецилфосфита (9) в качестве нуклеотидной компоненты на последней стадии твердофазного амидофосфитного синтеза и удаление третильной защитной группы с образованием свободной сульфгидрильной группы. Синтез соединения (9) представлен на схеме 3. Его проводили на основе коммерчески доступного 12-бромдодеканола-1 (7). Синтез включает две стадии - нуклеофильное замещение брома в 12-бромдодеканоле-1 (7) на третилтиольную группу и фосфитирование гидроксильной группы 12-(8-третил)меркаптододеканола-1 (8).



На первой стадии тритилтиолят-анион генерировали непосредственно перед реакцией действием гидроксида натрия на тритилмеркаптан в смеси этанола с бензолом 1:1. Продукт (8) выделяли хроматографически на колонке с силикагелем.

На второй стадии 12-(8-тритил)меркаптододеканол-1 (8) фосфитировали **N,N-диизопропиламино-β-цианэтилхлорфосфитом** в присутствии Br^- -диизопропилэтиламина. Отработка условий реакции показала, что выход продукта фосфитирования по стандартной методике составлял не более 50%. В связи с этим вместо двукратного избытка фосфитирующего агента использовали четырехкратный избыток, с повышением выхода до 65-70%.

Полученный N,N-диизопропиламино-β-цианэтил-12-(8-тритил)-меркаптододецилфосфит (9) встраивали в олигонуклеотиды на последней стадии автоматического олигонуклеотидного синтеза, увеличивая время конденсации до 4 минут. Концентрация амидофосфита (9), подаваемого на колонку с полимерным носителем, содержащим синтезируемый олигонуклеотид, составляла 0,12 М.

Синтезированные 5'-O-(12-(8-тритил)меркаптододецил)-олигонуклеотиды (ХП а - XVI а) приведены в табл. 2.

5'-O-(12-(8-Тритил)меркаптододецил)олигонуклеотиды выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства тритильной группы и додецильного линкера. Реакционная смесь содержала три продукта, различающихся по времени удерживания при анализе ВЭЖХ на колонке С-18. Продукт с минимальным временем удерживания соответствовал олигонуклеотиду, не содержащему 5'-концевого нуклеозидного звена. Наибольшим временем удерживания обладал целевой олигонуклеотид, содержащий тритильную защитную группу на конце сульфгидрильного линкера. Промежуточное время удерживания имел олигонуклеотид, не содержащий тритильной защитной группы на конце сульфгидрильного линкера. Образование таких продуктов возможно в результате окисления иодом на завершающей стадии олигонуклеотидного синтеза.

Таблица 2.

5'-O-(12-(8-Тритил)меркаптододецил)- и 5'-O-(12-меркаптододецил)олигонуклеотиды

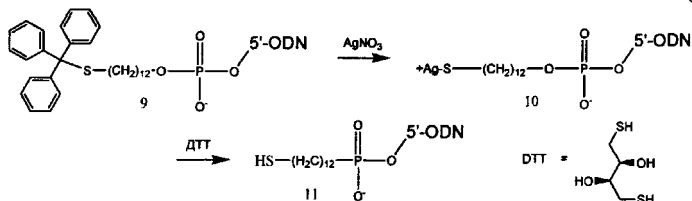
	Первичная структура (5' → 3')
XII a,b	$\underline{\text{X}}$ - (T) ₁₀
XIII a,b	$\underline{\text{X}}$ -d (CCC AAAAGT GAAAACAC)
XIV a,b	$\underline{\text{X}}$ -d (CACCTTGCTGAAATTTCC)
XV a,b	$\underline{\text{X}}$ -d (CCTTCAATATGACTTTTATC)
XVI a,b	$\underline{\text{X}}$ -d (GGAAAATTTTCAGCAAGGTG)

a: $\text{X} = \text{TrS}-(\text{CH}_2)_{12}\text{-OPO}(\text{OH})-$

b: $\text{X} = \text{HS}-(\text{CH}_2)_{12}\text{-OPO}(\text{OH})-$

Следующей стадией синтеза являлось селективное деблокирование сульфгидрильной группы в выделенных олигонуклеотидах XII а - XVI а. Олигонуклеотид, содержащий блокированную сульфгидрильную группу, обрабатывали водным раствором нитрата серебра. После добавления нитрата серебра выпадал характерный желтоватый осадок серебряной соли 5 -меркаптоолигонуклеотида (10), который взбалтывали в течение часа и добавляли избыток раствора дитиотрейтола для получения олигонуклеотида, содержащего свободную сульфгидрильную группу. Последовательность реакций представлена на схеме 4.

Схема 4



Таким образом, были синтезированы 5 -O-(12-меркаптододecil)олигонуклеотиды (11) (XII б - XV б) (табл. 2).

Олигонуклеотиды (XII а,б) являются модельными, в то время как последовательности целевых олигонуклеотидов (XIII а,б - XVI а,б) комплементарны участкам генома патогенной бактерии *Salmonella*.

2. Свойства олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина

2.1. Исследование термической стабильности дуплексов, образованных модифицированными олигонуклеотидами

Было проведено исследование термической устойчивости дуплексов, образуемых модифицированными олигонуклеотидами (I) - (V), а также природным олигонуклеотидом (IX) с комплементарным 20-звенным олигонуклеотидом (X), не содержащим модификаций. Температуры плавления дуплексов (табл. 3), образованных олигонуклеотидами, несущими модификацию на 3 - или на 5 -конце (дуплексы А и Е, соответственно), в пределах ошибки эксперимента не отличались от температуры плавления природного дуплекса F. Значение температуры плавления дуплекса, содержащего модификации на обоих концах цепи (дуплекс С), немного ниже (различие составляет 5°). Как и ожидалось, наличие модифицированного звена внутри цепи (дуплексы В и /)) снижает термическую устойчивость в большей степени. Так, температура плавления дуплекса D на 9°, а дуплекса В, содержащего модификации как внутри, так и на конце цепи, на 10° ниже температуры плавления природного дуплекса F. Безусловно, наличие объемного гидрофобного заместителя в составе гетероциклического основания препятствует образованию водородных связей с комплементарным основанием, однако, как показали проведенные исследования, существенное влияние на температуру плавления такие заместители оказывают лишь в составе неконцевых звеньев. Несущественный вклад концевых звеньев в дестабилизацию можно объяснить известным эффектом «дыхания» концевых фрагментов ДНК-дуплекса, количество междуатомных водородных связей в которых не влияет в существенной степени на температуру плавления.

Таблица 3.

Температуры плавления ДНК-дуплексов, содержащих модификации (А-Е) и природного дуплекса (F).

ДНК-дуплексы	Олигонуклеотиды	Первичная структура (5 - 3) (3 - 5)	T _{пл.} °C ±1
A	(I) (X)	CACCTTGCTGAAATTTTCCC* GTGGAACGACTTTAAAAGGG	41
B	(II) (X)	CAC*CTTGCTGAAATTTTCCC* GTG GAACGACTTTAAAAGGG	33
C	(III) (X)	C*ACCTTGCTGAAATTTTCCC* G TGAACGACTTTAAAAGGG	38
D	(IV) (X)	CAC*CTTGCTGAAATTTTCCC GTG GAACGACTTTAAAAGGG	34
E	(V) (X)	C*ACCTTGCTGAAATTTTCCC G TGAACGACTTTAAAAGGG	41
F	(IX) (X)	CACCTTGCTGAAATTTTCCC GTGGAACGACTTTAAAAGGG	43

C*- N³-олеил-5-метил-2-дезокситидин

2.2. Устойчивость олигонуклеотидов с остатками олеиламина к ферментативному гидролизу

Устойчивость олигонуклеотидов, содержащих 5 - и 3 -концевые остатки олеиламина, к ферментативному гидролизу исследовали в условиях гидролиза до нуклеозидов ФДЭ змеиного яда в смеси со щелочной фосфатазой с последующим анализом гидролизата методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Была изучена кинетика реакции ферментативного гидролиза немодифицированного олигонуклеотида (IX) (рис. 3а) и олигонуклеотида (III), содержащего гидрофобные остатки на обоих концах (рис. 3б). В качестве внутреннего стандарта для минимизации погрешности эксперимента при анализе реакционных смесей методом обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали уридин. Полученные данные позволяют сравнить скорости гидролиза модифицированного (III) и немодифицированного (IX) олигонуклеотидов. В концентрационном диапазоне, далеком от субстратного насыщения ($C_s=1,2 \cdot 10^{-3} M$), убыль концентрации олигонуклеотидов в процессе ферментативного гидролиза удовлетворительно описывается экспоненциальной зависимостью от времени. Отношение начальных скоростей гидролиза олигонуклеотидов (K) и (Проставляет $5,6 \pm 0,6$, то есть наличие остатка олеиламина в составе 3 -концевого звена олигонуклеотида вызывает существенное замедление ферментативного гидролиза олигонуклеотида по сравнению с немодифицированным аналогом, что позволяет проводить с использованием модифицированных олигонуклеотидов анализ природных объектов, содержащих ДНК, без дополнительной очистки.

2.3. Ферментативное лигирование олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина

Существует метод детекции гибридизации с использованием эффектов светорассеяния (методом турбидиметрии) и поглощения ультразвука (методом вельосиметрии) растворов, содержащих коллоидные частицы - липосомы диолеилфосфатидилолина. Олигонуклеотиды с гидрофобными заместителями - остатками олеиламина планировалось встраивать в поверхность липосом. Использовались два типа олигонуклеотидов, несущие остатки олеиламина в составе 3 - и 5 -концевых звеньев (олигонуклеотиды I и V, соответственно, см. табл. 1). При добавлении в раствор однопечного олигонуклеотида, содержащего участки, комплементарные свободным фрагментам последовательностей I и V, происходила гибридизация, причем процесс

формирования дуплексов между комплементарными фрагментами иммобилизованных олигонуклеотидов вызывал агрегацию частиц (рис. 4) и его удавалось зафиксировать по изменению оптических и акустических характеристик раствора.

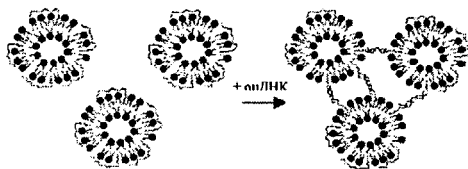


Рис. 4

Для подтверждения возможности гибридизации олигонуклеотидов, связанных с поверхностью липосом, с комплементарными фрагментами из раствора, необходимо было зафиксировать образование дуплексов. Для доказательства гибридизации нами было проведено изучение возможности ферментативного лигирования Т4-ДНК-лигазой связанных с липосомами олигонуклеотидов. В случае образования дуплекса на «матричном» олигонуклеотиде из раствора и прохождения реакции лигирования можно зафиксировать олигонуклеотидные продукты реакции, более протяженные, чем исходные олигонуклеотиды.

ДНК-лигаза способна ликвидировать одноцепочечные разрывы в ДНК-дуплексах, причем в случае, когда разрывы в противоположных цепях смещены друг относительно друга на несколько пар оснований, принято говорить о системе с «липкими концами». Известны примеры, когда дуплексы лигировались «тупыми концами». В нашем случае система с «липкими концами» представлена олигонуклеотидами V и I (или V и IX), табл. 1, с использованием в качестве матрицы олигонуклеотида XI (5'-AGCAAGGTGGGGAAAATTTC). В случае матрицы X образования совместного дуплекса олигонуклеотидами V и I не произойдет, однако следует принимать во внимание возможность образования двух независимых дуплексов V+X, I+X, а также их лигирования «тупыми концами» (табл. 4). При этом во всех случаях эффективность лигирования напрямую связана со способностью фрагментов ДНК образовывать стабильные дуплексы как в растворе, так и на поверхности липосом. Далее рассмотрены все возможные комбинации, при которых имела место реакция ферментативного лигирования с участием исследуемых фрагментов ДНК. В частности, рассматривались случаи, когда реакция происходила не только «липкими», но и «тупыми» концами. Возможность такого лигирования является дополнительным подтверждением эффективной гибридизации олигонуклеотидов, иммобилизованных на поверхности липосом, с комплементарными фрагментами из раствора.

В случае, когда лигирование требовалось проводить в присутствии липосом, их формировали в растворе методом впрыска под давлением спиртового раствора диолеилфосфатидилхолина. Продукты реакции после разрушения липосом додецилсульфатом натрия анализировали по относительной подвижности в 20% денатурирующем ПААГ. С целью количественного определения продуктов реакции лигирования на электрофореграммах в состав олигонуклеотидов IX и I, содержащих свободные 5'-концевые гидроксильные группы, вводили ³²P-радиоактивный фосфат.

Таблица 4.

Выходы продуктов лигирования олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина, в присутствии и в отсутствие липосом.

Первичная структура (5 -3) (3 -5)	состав	Присут- ствие липосом	Выход продуктов лигирования
CACCTTGCTGAAATTTCCCPACCTTGCTGAAATTTCCC CTTTAAAAGGG-GTGAACGA	2*IX+XI	-	90%
C*ACCTTGCTGAAATTTCCCPACCTTGCTGAAATTTCCC CTTTAAAAGGG-GTGAACGA	V+IX+XI	-	80%
C*ACCTTGCTGAAATTTCCCPACCTTGCTGAAATTTCCC* CTTTAAAAGGG-GTGAACGA	I+V+XI	-	70%
C*ACCTTGCTGAAATTTCCCPACCTTGCTGAAATTTCCC* CTTTAAAAGGG-GTGAACGA	I+V+XI	+	65%
GGGAAAATTCAGCAAGGTGPACCTTGCTGAAATTTCCC CCCTTTAAAGTCGTTCCACPGTGAACGACTTTAAAAGGG	2*IX+2*X	-	45%
C*ACCTTGCTGAAATTTCCCPACCTTGCTGAAATTTCCC* G TGAACGACTTTAAAAGGG GTGAACGACTTTAAAAGGG	I+V+2*X	-	60%
C*ACCTTGCTGAAATTTCCCPACCTTGCTGAAATTTCCC* GTGAACGACTTTAAAAGGG GTGAACGACTTTAAAAGGG	I+V+2*X	+	65%
GGGAAAATTCAGCAAGGTGPACCTTGCTGAAATTTCCC* C*CCTTTTAAAGTCGTTCCACPGTGAACGACTTTAAAAGGG	2*I+2*X	-	60%
GGGAAAATTCAGCAAGGTGPACCTTGCTGAAATTTCCC* C*CCTTTTAAAGTCGTTCCACPGTGAACGACTTTAAAAGGG	2*I+2*X	+	60%

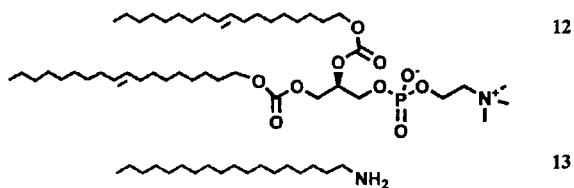
C* - N'-олеил-5-метил-2-дезоксигуанидин

Данные о влиянии липосом на способность связанных с ними олигонуклеотидов с гидрофобными заместителями образовывать дуплексы обобщены в табл. 4. Наибольший выход продуктов лигирования наблюдается в случае немодифицированных олигонуклеотидов, образующих дуплекс с «липкими концами». Наличие гидрофобных заместителей закономерно снижает эффективность реакции, причем присутствие в растворе липосом, с которыми связаны модифицированные олигонуклеотиды, практически не оказывает влияние на величину выхода продуктов ферментативного лигирования (70 и 65%, соответственно). Ситуация с лигированием «тупыми концами» обратная - наличие остатков олеиламина и присутствие связанных с ними липосом в 1,5 раза повышало выходы продуктов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что олигонуклеотиды способны эффективно образовывать дуплексные структуры на поверхности липосом.

2.4. Влияние олигонуклеотидов с гидрофобными заместителями на свойства фосфолипидных монослоев на границе раздела вода-воздух.

Нам представлялось интересным изучить особенности гибридизации коротких фрагментов ДНК на поверхности мономолекулярных липидных слоев, образующихся на границе вода-воздух, а также влияние на гибридизацию ориентации олигонуклеотидных цепей на поверхности таких слоев. В качестве исследуемых фрагментов ДНК мы использовали 19-звенные олигонуклеотиды (табл. 1), модифицированные остатками олеиламина по 3 -концу (I), а также по обоим концам одновременно (III).

Данные модификации позволяли включать олигонуклеотиды в состав монослоев диолеилфосфатидилхолина, а также смешанных монослоев диолеилфосфатидилхолина (12) с октадециламином (13).



В результате на границе раздела вода - воздух образовывался смешанный слой ДНК/липид. Наличие в составе концевых участков олигонуклеотидов длинного гидрофобного заместителя позволяло им встраиваться в гидрофобную часть монослоя, оставляя олигонуклеотид экспонированным в раствор и способным к гибридизации с комплементарной последовательностью. Характеристикой поверхностного слоя являлась изотерма сжатия (поверхностное давление Π - площадь поверхности A) монослоев Лэнгмюра. По изотерме однородного слоя липида на чистой поверхности можно судить о площади, приходящейся на одну молекулу монослоя, которая в нашем случае составила $0,57 \pm 0,02 \text{ nm}^2$. Сдвиг изотермы в ту или иную сторону позволяет говорить об изменении поверхностной плотности вследствие тех или иных изменений структуры монослоя. Гибридизация олигонуклеотидов, связанных с липидными монослоями, с комплементарной последовательностью, ведет к изменению геометрии и жесткости фрагментов монослоя, благодаря чему сравнение изотерм может использоваться для детекции гибридизации (рис. 7).

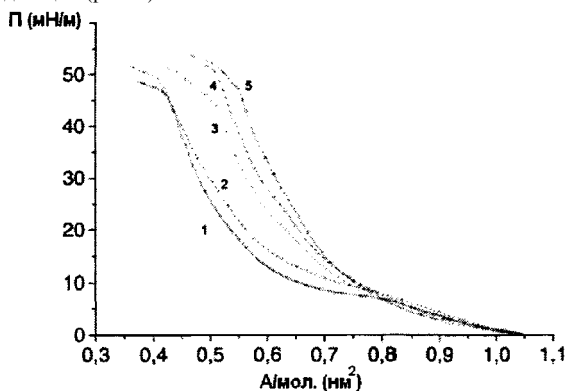


Рис. 7. Изотермы монослоя диолеилфосфатидилхолина (1) в присутствии природного олигонуклеотида IX, (2), олигонуклеотида III, содержащего остатки олеиламина на обоих концах (3), смеси III с некомплемтарной последовательностью IX (4) и дуплекса III+X(5).

В соответствии с полученными нами результатами, присутствие в растворе олигонуклеотида IX табл. 5, не содержащего остатков олеиламина, не вызывало изменений в характере изотермы, однако относительно чистого фосфатидилхолина (рис. 7, кривая 1) параметры монослоя изменились - поверхностное давление увеличилось (рис. 7, кривая 2). Как следствие, изменились и давления перехода между фазами (8 мН/м и 50,5 мН/м). Кроме того, площадь, приходящаяся на молекулу монослоя, существенно увеличилась (табл. 5) Эффект, видимо, объясняется изменением ионной силы буферного раствора, вызванным присутствием олигонуклеотида, поскольку поверхностное давление находилось в прямой зависимости от концентрации олигонуклеотида.

Таблица 5

Площадь, приходящаяся на одну молекулу фосфолипида в монослое диолеилфосфатидилхолина в присутствии олигонуклеотидов и ДНК-дуплексов.

Олигонуклеотиды, присутствующие в растворе	Площадь на молекулу, А, нм ²
В отсутствие	0.57±0.02
IX	0.60±0.02
III	0.65±0.02
смесь III + IX	0.67±0.02
дуплекс III+ X	0.70±0.02
I	0.68±0.02
смесь I + IX	0.66±0.02
дуплекс I+ X	0.65±0.02

Аналогичные результаты были получены в случае взаимодействия монослоя с олигонуклеотидом I, содержащим гидрофобный остаток на только на 3 -конце. В том случае, если в растворе присутствовал олигонуклеотид I, поверхностное давление и площадь на молекулу существенно увеличивались по сравнению с чистым монослоем (рис. 8, кривые 1 и 2). Однако, в обоих случаях, когда к системе добавляли олигонуклеотид, некомплементарный (IX) или комплементарный (X) встроенному в монослой, изотерма смещалась в сторону уменьшения площади, приходящейся на молекулу липида (рис. 8, кривые 3 и 4, соответственно). Как видно из сравнения изотерм 3 и 4, изменения как площади, так и поверхностного давления, были более выражены в случае присутствия в растворе комплементарной цепи.

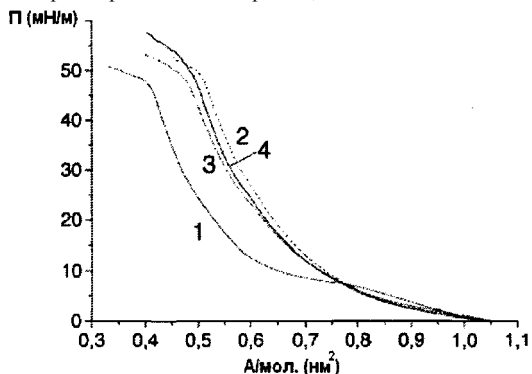


Рис.8 Изотермы монослоя диолеилфосфатидилхолина (1) в присутствии олигонуклеотида I, содержащего концевой остаток олеиламина (2), дуплекса I+X(3) и смеси I с некомплементарной последовательностью IX (4).

Рассчитанные значения площади, приходящейся на молекулу липида, практически совпадают для систем, в которые добавлен олигонуклеотид, комплементарный либо некомплементарный встроенному в монослой.

Изменение поверхностных свойств липидного монослоя в конденсированном состоянии (Π) в преобладающей степени определялось электростатическими взаимодействиями с отрицательно заряженными фосфатными группами олигонуклеотида. Максимальное рассчитанное молярное соотношение ДОФХ/олигонуклеотид составляло в условиях эксперимента 15 для одноцепочечных и 7,5 для двухцепочечных олигонуклеотидов. Регистрируемые изменения площади поверхности, составляющие 0,03-0,07 нм² (табл. 5),

находятся в хорошем соответствии с теоретически возможными изменениями, возникающими благодаря электростатическим взаимодействиям ДОФХ с олигонуклеотидами.

Таким образом, анализ изотерм сжатия Лэнгмюра-Блоджетта позволил провести изучение особенностей взаимодействия коротких олигонуклеотидов с липидными монослоями. Нами показано, что введение гидрофобных остатков олеиламина оказывает влияние на величину поверхностного давления. Данный эффект оказался более значимым для олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные заместители на обоих концах цепи. Ориентация олигонуклеотидов относительно поверхности монослоя в существенной степени влияет на способность олигонуклеотидов образовывать дуплексы с комплементарными фрагментами. Полученные нами закономерности позволяют использовать подобные системы для детекции ДНК-гибридации на поверхности фосфолипидных монослоев.

3. Создание ДНК-биосенсора для детекции повреждений в ДНК-дуплексах

Метод обнаружения повреждений в составе ДНК-дуплексов предусматривал их иммобилизацию на поверхности золотого электрода за счет введенных в состав одного из олигонуклеотидов меркаптогрупп и электрохимическую детекцию индикатора метиленового синего в растворе с использованием полученного электрода в качестве рабочего в трехэлектродной ячейке. В качестве метода анализа использовалась дифференциальная импульсная вольтамперометрия (рис. 9).

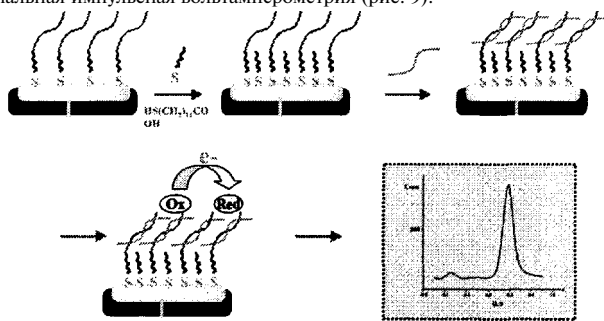


Рис. 9. Схема ДНК-биосенсора для детекции повреждений в ДНК-дуплексах методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии.

3.1. Иммобилизация олигонуклеотидов на поверхности золотого электрода

Для получения слоя ДНК использовалась прямая иммобилизация тиолсодержащих олигонуклеотидов на очищенной поверхности золотого электрода. Электрод представлял собой золотой диск диаметром 2 мм, помещенный в изолирующую тефлоновую трубку.

Мы улучшили традиционно используемую методику иммобилизации, заключающуюся в хемосорбции тиолсодержащих молекул на золотой поверхности из ТРИС/ЭДТА буферного раствора в течение 12 часов при 4°C. Для ускорения процесса мы использовали хемосорбцию в сочетании с приложением к электроду потенциала +0,6В (отн. Ag/AgCl). Положительный заряд поверхности золота ускорял диффузию отрицательно заряженных молекул ДНК из раствора, что позволяло добиться аналогичных результатов, сокращая время с 12 часов до 30 мин. при одинаковой концентрации олигонуклеотидов - 5 мкМ. Для устранения неспецифической адсорбции электроактивных веществ на электроде использовалась 11-меркаптоундекановая кислота, несущая отрицательно заряженные карбоксильные группы.

Для исследования электрохимических свойств золотой дисковый электрод с иммобилизованной ДНК погружали в ячейку с буферным раствором, содержащим редокс-

активные индикаторы - метиленовый синий в концентрации 2мкМ и $K_3Fe(CN)_6$ в концентрации 2мМ. Насыщенный Ag/AgCl электрод использовали в качестве электрода сравнения, в качестве вспомогательного электрода - платиновую проволоку.

3.2. Выбор электрохимического индикатора и метода анализа

Метиленовый синий (метиленовый голубой, Methylene Blue, схема восстановления приведена на рис. 10) выбран в качестве индикатора благодаря его способности связываться с ДНК, которая использовалась в ряде работ для детекции ДНК-гибридизации и обнаружения некомплементарных пар, в частности, на золотых электродах.

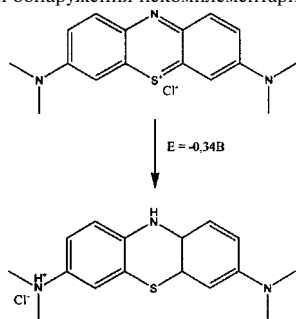


Рис. 10. Переход «метиленовый синий» (окисленная форма, MB⁺) → «лейкометиленовый синий» (восстановленная форма, LB)

При связывании метиленового синего с иммобилизованной на поверхности электрода ДНК имеет место электрокаталитический процесс с участием индикатора, причем перенос электронов от поверхности электрода к молекуле интеркалятора осуществляется, предположительно, с помощью я-системы ДНК-дуплекса. С целью получения более интенсивного отклика от сенсора, в качестве электрохимического сигнала нами использовался пик восстановления дополнительно введенного ферроцианида калия, часто используемого одновременно с метиленовым синим в качестве т.н. «жертвемого реагента». Электрокаталитический процесс на поверхности электрода, таким образом, включает восстановление ферроцианида $Fe[(CN)_6]^{3-}$ до $Fe[(CN)_6]^{4-}$, причем перенос электронов осуществлялся через связанную с ДНК восстановленную форму интеркалятора - лейкометиленового синего, электрохимически связанного с поверхностью за счет я-системы ДНК-дуплекса. В случае дуплекса, содержащего некомплементарные пары оснований (слева), каталитический сигнал практически исчезает, поскольку невозможен перенос электронов через слой ДНК. По нашему предположению, подобная система должна позволять фиксировать наличие не только некомплементарных пар природных оснований, но и других нарушений в структуре ДНК, связанных с химическими изменениями ее фрагментов, которые затрудняют перенос электронов через ДНК-дуплекс. В частности, к таким изменениям относится возникновение АП-сайтов и дезаминированных оснований. При этом интенсивность пиков на дифференциальной импульсной вольтамперограмме может являться количественным критерием и находиться в обратной зависимости от количества повреждений в ДНК. В качестве максимального значения тока использовался сигнал ферроцианид-ионов на электроде, покрытом совершенным дуплексом.

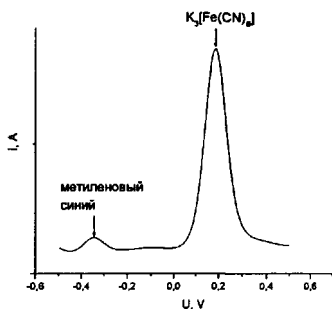


Рис. 11. Вольтамперограмма раствора, содержащего 2мкМ метиленового синего и 2мМ ферроцианида калия на ДНК-модифицированном электроде.

На дифференциальной импульсной вольтамперограмме метиленового синего пик восстановления данного соединения на поверхности золотого электрода, покрытого слоем ДНК, возникал при значении потенциала $-0,32$ В отн. Ag/AgCl , а присутствие в растворе ферроцианида калия вызывало появление пика его восстановления при потенциале $+0,21$ В (рис. 11).

Было отмечено, что в случае ДНК-модифицированного электрода интенсивность пика ферроцианида калия существенно увеличивалась при совместном присутствии в растворе обоих электроактивных соединений (рис. 12).

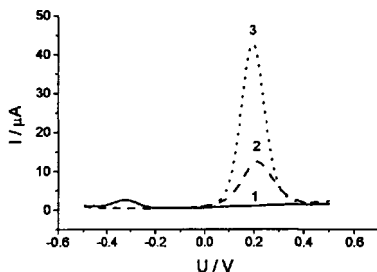
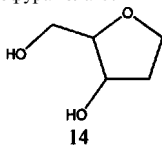


Рис. 12. Вольтамперограмма раствора, содержащего 2мкМ метиленовый синий (1), 2мМ ферроцианид калия (2), 2мкМ метиленовый синий + 2мМ ферроцианид калия (3) на ДНК-модифицированном золотом электроде.

Такого эффекта не наблюдалось в случае чистого золотого электрода (пики ферроцианида идентичны по величине в присутствии и в отсутствие метиленового синего).

3.3. Определение наличия и количества АП-сайтов в двухцепочной ДНК методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии

С использованием полученных олигонуклеотидов нами было изучено влияние одного или нескольких АП-сайтов на перенос заряда через 19-звенный дуплекс, иммобилизованный на золотом электроде. В связи с тем, что АП-сайты, возникающие в естественных условиях, нестабильны (вследствие возможности **β -элиминирования** и последующего разрыва цепи ДНК), нами были использованы их структурные аналоги - остатки 2-(гидроксиметил)тетрагидрофуранола-3.



Замещая в процессе автоматического синтеза, необходимое число оснований на остатки тетрагидрофуранола, мы получили набор олигонуклеотидов, комплементарных целевым в различной степени. Нами была синтезирована серия олигонуклеотидов, содержащих остатки тетрагидрофуранола в одном, двух и трех выбранных положениях олигонуклеотидной цепи (табл. 6).

Таблица 6.

Олигонуклеотиды, содержащие остатки 2-(гидроксиэтил)тетрагидрофуранола-3

Олигонуклеотид	Первичная структура (5'-3')
XVII	GGAAAATTTTC <u>RC</u> GCAAGGTG
XVIII	GGAAAATTTTC <u>RC</u> <u>R</u> GCRAGGTG
XIX	GGAA <u>R</u> ATTTTC <u>RC</u> GCRAGGTG
XX a,b	<u>X</u> -GGAAAATTTTC <u>RC</u> GCAAGGTG
XXI a,b	<u>X</u> -GGAAAATTTTC <u>RC</u> <u>R</u> GCRAGGTG
XXII a,b	<u>X</u> -GGAA <u>R</u> ATTTTC <u>RC</u> <u>R</u> GCRAGGTG

a: $X = TrS-(CH_2)_{12}-OPO(OH)-$

b: $X = HS-(CH_2)_{12}-OPO(OH)-$

R = 2-(гидроксиэтил)тетрагидрофуранол-3

В результате гибридизации последовательностей XVII - XIX с олигонуклеотидом XFVb, иммобилизованном на золотом электроде за счет концевой сульфгидрильной группы, АП-сайты оказывались расположены напротив остатков тимидина. В качестве контролей на золоте иммобилизовали олигонуклеотиды, содержащие одновременно АП-сайты и меркаптододецильные линкеры (XXb - XXIIb) а также олигонуклеотид XVIb, и проводили гибридизацию с немодифицированным олигонуклеотидом IX.

Измерения, проведенные для чистого метиленового синего в отсутствие ферроцианида калия показали, что между количеством АП-сайтов в составе дуплекса и интенсивностью пика метиленового синего зависимости установить не удалось. Интенсивность пика ферроцианида оказалась значительно более зависимой от состояния ДНК на поверхности электрода - при переходе от одноцепочечных олигонуклеотидов к дуплексу амплитуда пика восстановления $[Fe(CN_6)]^{3-}$ увеличивалась на порядок. Увеличение интенсивности пика ферроцианида может объясняться затруднениями его окисления непосредственно на поверхности золота, экранированного отрицательно заряженными молекулами олигонуклеотидов. В этом случае, как уже упоминалось, метиленовый синий, связанный с ДНК, вероятнее всего, играет роль переносчика электронов к молекулам ферроцианида из раствора.

Для детекции повреждений в структуре ДНК-дуплексов использовались модельные двухцепочечные 19-звенные фрагменты ДНК, последовательности которых представлены в табл. 7.

Таблица 7.

ДНК-дуплексы с различным числом остатков тетрагидрофуранола

Олигонуклеотиды	Первичная структура (5'-3')
XVIb + IX	<u>X</u> -GGAAAATTTTCAGCAAGGTG CCTTTTAAAGTCGTTCCAC
XXb + IX	<u>X</u> -GGAAAATTTTC <u>RC</u> GCAAGGTG CCTTTTAAAGTCGTTCCAC
XXIb + IX	<u>X</u> -GGAAAATTTTC <u>RC</u> <u>R</u> GCRAGGTG CCTTTTAAAGTCGTTCCAC
XXIIb + IX	<u>X</u> -GGAA <u>R</u> ATTTTC <u>RC</u> <u>R</u> GCRAGGTG CCTTTTAAAGTCGTTCCAC

X - $OP(=O)(OH)-O-(CH_2)_{11}-SH$,

R - 2-(гидроксиэтил)тетрагидрофуранол-3

На рис. 13 сравниваются амплитуды пиков восстановления ферроцианида на электроде, содержащем совершенный дуплекс состава **XVIIb** + IX и дуплекс с различным количеством АП-сайтов (1, 2 и 3)

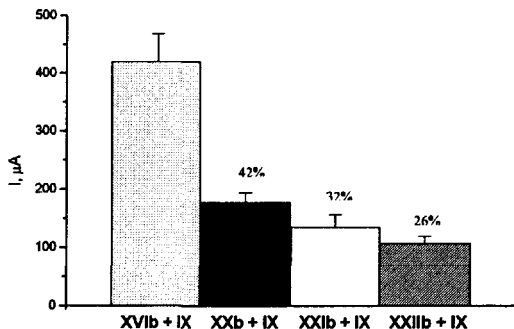
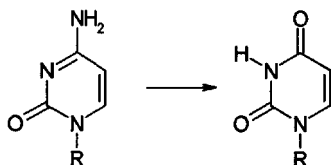


Рис. 13. Интенсивность пика ферроцианида калия (2 мМ) в присутствии метиленового синего (2 мкМ) на электродах, содержащих совершенный дуплекс состава **XVIIb** + IX и дуплексы (**XXb**-**XXIIb**) + IX с различным количеством АП-сайтов (1, 2 и 3).

Амплитуда сигнала восстановления ферроцианида для неповрежденного дуплекса была в ~2,4 раза выше, чем для дуплекса состава **XXb** + IX, содержащего один АП-сайт. Далее средние значения величины пиков уменьшались с увеличением числа АП-сайтов. Эффективность восстановления индикатора в случае дуплексов, содержащих два и три АП-сайта, была в 3 и 4 раза меньше по сравнению с совершенным дуплексом. Наличие АП-сайтов должно затруднять процесс переноса электронов через двойную спираль ДНК. Сильное уменьшение пика согласуется также с полученными данными по термической стабильности дуплексов, содержащих АП-сайты.

3.4. Определена наличие дезаминированных оснований в двухцепочечной ДНК.

Известно, что остатки цитозина в природных ДНК наиболее всего подвержены дезаминированию.



Нами изучено влияние наличия дезаминированных оснований в дуплексах на электрохимические свойства редокс-пары метиленовый синий / ферроцианид калия. При этом в качестве аналога поврежденного основания нами был использован искусственно включаемый в олигонуклеотидную цепь остаток 2-дезоксисуридина. Были синтезированы олигонуклеотиды **XXIII**-**XXV**, содержащие остатки дезоксиуридина, и комплементарный олигонуклеотид **XXVI**, содержащий на 5-конце линкер с тиольной группой для иммобилизации на золотом электроде (табл. 8)

Таблица 8.

<i>Олигонуклеотиды, содержащие остатки дезоксиуридина</i>	
Олигонуклеотиды	Первичная структура (5'-3')
XXIII	TCACCTTG <u>U</u> TGACATTTT
XXIV	TCACCTTG <u>U</u> TGAUATTTT
XXV	TCAU <u>C</u> TTG <u>U</u> TGAUATTTT
XXVI	<u>X</u> -AAAATGTCAGCAAGGTGA
XXVII	TCACCTTGCTGACATTTT

X - OP(=O)(OH)-O-(CH₂)₁₁-SH
U - дезоксиуридин

Для вольтамперометрической детекции повреждений в составе ДНК-дуплекса нами использовался электрокаталитический процесс с участием метиленового синего, связанного со слоем ДНК на золотом электроде, и «жертвемого реагента» - ферроцианида калия. В качестве системы, моделирующей повреждения в природных двуспиральных ДНК, использовались дуплексы олигонуклеотидов **XXIII-XXV** с иммобилизованным серосодержащим олигонуклеотидом **XXVI**.

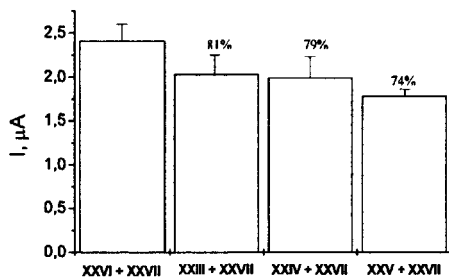


Рис. 14. Интенсивность пика ферроцианида калия (2 мМ) в присутствии метиленового синего (2 мМ) на электродах, содержащих совершенный дуплекс состава **XXVI + XXVII** и дуплексы (**XXIII-XXV**) + **XXVI** с различным количеством дезаминированных оснований (12 и 3).

По сравнению с полностью комплементарным дуплексом значения амплитуды пиков, соответствующих dUdG-парам ниже, однако, разница была не столь существенной, как в случае дуплексов с одним или несколькими АП-сайтами (рис. 14). Возможность эффективного электронного транспорта в дуплексах, образованных олигонуклеотидами с остатками дезоксиуридина, вероятно, объясняется тем, что между гуанином и урацилом образуются водородные связи, и хотя dUdG-пары вносят некоторые искажения в структуру двойной спирали и влияют на ее термодинамические свойства, я-система дуплекса нарушается в меньшей степени, чем при отсутствии основания.

Выводы

1. Показана возможность использования олионуклеотидов с гидрофобными заместителями для детекции гибридизации и наличия повреждений в ДНК

2. Впервые синтезированы олигонуклеотиды, содержащие остатки олеиламина в N4-положении цитидина, а также 12-тримилмеркаптододеканола-1 и 12-меркаптододеканола на 5-концах. Концевые гидрофобные заместители оказывают незначительное влияние на термическую стабильность ДНК-дуплексов.

3. Впервые осуществлена детекция гибридизации олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина, на поверхности липосом диолеилфосфатидилхолина.

4. Присутствие одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов с остатками олеиламина вызывает сдвиг изотерм сжатия липидных монослоев на поверхности раздела вода-воздух, благодаря чему впервые зафиксирована гибридизация олигонуклеотидов с остатками олеиламина на поверхности фосфолипидного монослоя.

5. Впервые показано, что олигонуклеотиды с остатками 12-меркаптододеканола-1, иммобилизованные на золотом электроде, могут применяться для детекции АП-саптов и дезаминированных оснований в ДНК-дуплексах. На их основе создан прототип биосенсора для детекции повреждений в ДНК по сигналам электрохимических индикаторов метиленового синего и ферроцианида калия.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Андреев С.Ю., Анцыпович СИ., Волков Е.М., Романова Е.А., Гианик Т., Орешкая Т.С. (2001) Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина, для иммобилизации на поверхностях электродов. Биоорганическая химия, Т. 27, №3, с. 210-216.
2. Oretskaya T.S., Romanova E.A., Andreev S.Yu. Antsyovich S.I., To'th C, Gajdos V., Hianik T. (2002) A novel method of introducing hydrophobic moieties into oligonucleotides for covalent and non-covalent immobilisation on electrode surfaces. Bioelectrochemistry, 2002, V. 56, No. 1-2, p. 47-51
3. Hianik T., Rybar P, Andreev SY, Oretskaya TS, Vадgama P. (2004) Detection of DNA hybridization on a liposome surface using ultrasound velocimetry and turbidimetry methods. Bioorg Med Chem Lett. V. 14, N. 15, p. 3897-900.
4. Antsyovitch SI, Andreev SY, Oretskaya TS. (2003) Convenient solid-phase method of introduction of sulfhydryl groups into oligodeoxyribonucleotides via 2'-O-carbamate linkage. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, V. 22, N. 5-8, p. 1435-7.
5. Hianik T, Vitovic P, Humenik D, Andreev SY, Oretskaya TS, Hall EA, Vадgama P. (2003) Hybridization of DNA at the surface of phospholipid monolayers. Effect of orientation of oligonucleotide chains. Bioelectrochemistry. V. 59, N. 1-2, p. 35-40.
6. Зацепин Т.С., Андреев С.Ю., Гианик Т., Орешкая Т.С. (2003) Нуклеиновые кислоты, содержащие остаток ферроцена: синтез и электрохимические свойства. Успехи химии, Т. 72, №6, с. 602-621.



Подписано в печать 24 февраля 2005 г.

Заказ 458. Формат 60 х 90/16.

Тираж 100 экз.

Отпечатано в салоне оперативной печати ПКФ.
Москва, Садовая-Черногрязская, 3Б. Тел. 778-97-47