



УДК 577.113.6

ИНТЕРКАЛИРОВАННЫЕ МОТИВЫ ДНК С НЕНУКЛЕОЗИДНЫМИ ВСТАВКАМИ

© 2021 г. Н. А. Петрунина*, В. В. Лебедев**, Ю. Г. Кириллова**, А. В. Аралов***,
А. М. Варижук*, М. В. Сардушкин****, #

*ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Россия, 141701 Долгопрудный, Московская область, Институтский пер., 9

**ФГБОУ ВО МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

***ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

****ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

Поступила в редакцию 31.03.2021 г.

После доработки 10.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

Исследована цитозин-богатая последовательность из генома человека, предположительно участвующая в регуляции экспрессии гена *SHANK1* за счет формирования интеркалированного мотива (iM). Показано, что модификация, имитирующая отщепление гетероциклических оснований в петлях iM, существенно ускоряет конформационные переходы, индуцированные малыми изменениями рН. Эти результаты дополняют представления о связи репарации ДНК и формирования неклассических вторичных структур, а также открывают новые возможности в разработке олигонуклеотидных рН-сенсоров с быстрым откликом.

Ключевые слова: модификация ДНК, интеркалированные мотивы, кинетика

DOI: 10.31857/S013234232106021X

ВВЕДЕНИЕ

В промоторах ряда генов, включая гены семейства *SHANK*, не так давно были обнаружены С-богатые последовательности, которые формируют устойчивые С-квадруплексные структуры – интеркалированные мотивы (iM) [1–3]. Поскольку для образования ядра iM, представляющего собой параллельные дуплексы с гемипротонированными цитозиновыми парами, необходимо протонирование атома N3 остатков цитозина, большинство структур данного типа существует исключительно в слабокислой среде [4]. Однако последовательности общей формулы $C_{5+}N_xC_{5+}N_yC_{5+}N_z$, где $N_{x/y/z}$ – петли между С-блоками, могут образовывать стабильные iM и в нейтральной среде [2]. Теоретически iM, имеющие точку перехода (рН_{1/2} – значение рН, при котором половина молекул структурирована) около 7 и отличающиеся высокой кооператив-

ностью складывания/расплетания, чувствительны к малейшим изменениям рН в ядре; их можно назвать встроенными в геном рН-сенсорами. Поскольку промоторные iM рассматриваются как вероятные участники регуляции транскрипции [5, 6], их исследование актуально для выяснения связи изменений генной экспрессии с дисбалансом рН при нейродегенерации или онкотрансформации [7].

Целью данной работы была оценка влияния модификации на рН-чувствительность и кинетические параметры iM на примере С-богатого олигонуклеотида *SHA* из промотора гена *SHANK1*, ассоциированного с нейродегенерацией и нейропластичностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была рассмотрена модификация iM из промотора гена *SHANK1*, которая имитирует апуринизацию/эксцизию азотистых оснований в петлях iM (рис. 1а). Модификация представляет собой замену нуклеозидных остатков остатком 1',2'-дидезоксирибозы (далее – X). Анализ рН-чувстви-

Сокращения: ОДН – олигодезоксирибонуклеотид; оцОДН – одноцепочечный ОДН; FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; iM – интеркалированный мотив; TAMRA – 5,6-карбокситетраметилродамин.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 972-44-38; эл. почта: s_makar@mail.ru).

Таблица 1. Последовательности iM-образующих олигодезоксирибонуклеотидов, рН перехода и кинетические характеристики

Шифр	Последовательность, 5'→3'*	$pH_{1/2} \pm 0.1$	$K_{набл. pH 7.2 \rightarrow 6.6}, c^{-1**}$	$T_{1/2, pH 7.2 \rightarrow 6.6}, c$
SHA	d(CCCCCCTCCCCC ACCCCCACCCCC)	7.0	0.065 ± 0.001 (эксп. 1: $54 \pm 3\%$) 0.38 ± 0.02 (эксп. 2: $46 \pm 3\%$)	4.2 ± 0.2
SHA-1	d(CCCCCCTCCCCC XCCCCCACCCCC)	7.1	0.65 ± 0.02 (эксп. 1: $53 \pm 3\%$) 0.093 ± 0.002 (эксп. 2: $47 \pm 3\%$)	2.3 ± 0.1
SHA-2	d(CCCCCCXCCCCC ACCCCCXCCCCC)	7.1	0.065 ± 0.001 (эксп. 1: $66 \pm 10\%$) 0.12 ± 0.01 (эксп. 2: $54 \pm 10\%$)	1.5 ± 0.1
SHA-3	d(CCCCCCXCCCCC XCCCCCXCCCCC)	7.1	1.16 ± 0.001 (эксп. 1: $68 \pm 3\%$) 0.153 ± 0.004 (эксп. 2: $32 \pm 3\%$)	1.0 ± 0.1

* X – остаток 1',2'-дидезоксирибозы.

** Поскольку кинетические кривые представляют собой биэкспоненты, для каждого iM приведены два значения $K_{набл.}$, соответствующие двум экспонентам (эксп. 1 и эксп. 2). Относительные вклады этих экспонент (в процентах) приведены в скобках. Средние значения и погрешности рассчитаны по трем повторностям.

тельности iM (SHA) и его аналогов (SHA-1–SHA-3) выполняли методом флуориметрии. Для этого по 3'- и 5'-концам олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН) вводили флуоресцентные метки – остатки 5,6-карбокситетраметилродамина (TAMRA) и 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) соответственно. В сложном iM наблюдали FRET-эффект за счет сближения FAM и TAMRA. При этом флуоресценция обеих меток частично гасилась в составе iM за счет стекинг-взаимодействий флуорофоров с гемипротонированными цитозиновыми парами, и данный эффект тушения доминировал. Собственная рН-зависимость флуоресценции метки была незначительна на фоне тушения в iM. Разрушение iM при переходе от рН 6 к рН 8 сопровождалось увеличением интенсивности флуоресценции, и по полученным кривым методом регрессионного анализа определяли $pH_{1/2}$ (рис. 1б). Как видно из данных табл. 1, модификации в одной, двух или трех петлях практически не оказывали влияния на $pH_{1/2}$. Таким образом, удаление гетероциклических оснований в петлях не препятствует формированию iM при физиологических значениях рН.

Для оценки влияния модификации на кинетику конформационных переходов оОДН–iM при изменении рН использовали метод остановленного потока. Кинетические кривые изменения флуоресценции FAM в ответ на скачки рН $6.6 \leftrightarrow 7.2$ (рис. 1в) имели вид биэкспонент, что можно объяснить наличием двух изоформ iM: 5'E (в образовании наружной цитозиновой пары принимает участие 5'-концевой цитозин) и 3'E (наружная пара содержит 3'-концевой цитозин). Модификация iM не меняла кинетику отклика на скачок рН $6.6 \rightarrow 7.2$, но заметно увеличивала наблюдаемые константы скорости обратных процессов (соответственно, сокращалось время сворачивания iM – $T_{1/2, pH 7.2 \rightarrow 6.6}$). Мы предполагаем, что данный эффект обусловлен стерическим фактором. Эффект нарастал при переходе от единич-

ной модификации к модификации всех петель. Сходного результата можно ожидать при эксцизии гетероциклических оснований в возможных сайтах образования iM геномной ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

S-богатая последовательность SHA из промотора гена *SNAH1* (Gene ID: 50944) была выбрана как пример последовательности, формирующей термодинамически устойчивый iM в условиях, близких к физиологическим [1]. Природный ОДН SHA и его модифицированные аналоги SHA-1–SHA-3 получали твердофазным методом на автоматическом синтезаторе MerMade 6/12 DNA Synthesizer (BioAutomation, Германия) с использованием стандартных коммерческих реагентов, а также фосфорамидита d-spacer для введения остатка 1',2'-дидезоксирибозы (Glen Research, США), фосфорамидита FAM-производного (5'-концевое мечение ОДН) и модифицирующей смолы Алкин CPG для 3'-концевого мечения (Lumiprobe, Россия). Мечение по 3'-концу остатком TAMRA с аминопропильным линкером осуществляли методом клик-химии с использованием соответствующего азиды (Lumiprobe, Россия). ОДН выделяли хроматографически (чистота не менее 95% по данным ВЭЖХ), структуру и чистоту подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Для получения кривой рН-зависимости получали растворы ОДН (2 мкМ) в 140 мМ калий-фосфатном буфере заданного рН. Спектры флуоресценции FAM/TAMRA при возбуждении 490/560 нм регистрировали на флуоресцентном ридере Infinite 200 Pro (Tecan, Швеция) при комнатной температуре. Экспериментальную зависимость значения флуоресценции от рН аппроксимировали моделью Хилла, $pH_{1/2}$ определяли методом регрессионного анализа. Для получения кинетических кривых регистрировали изменения флуоресценции FAM после изменения значения рН

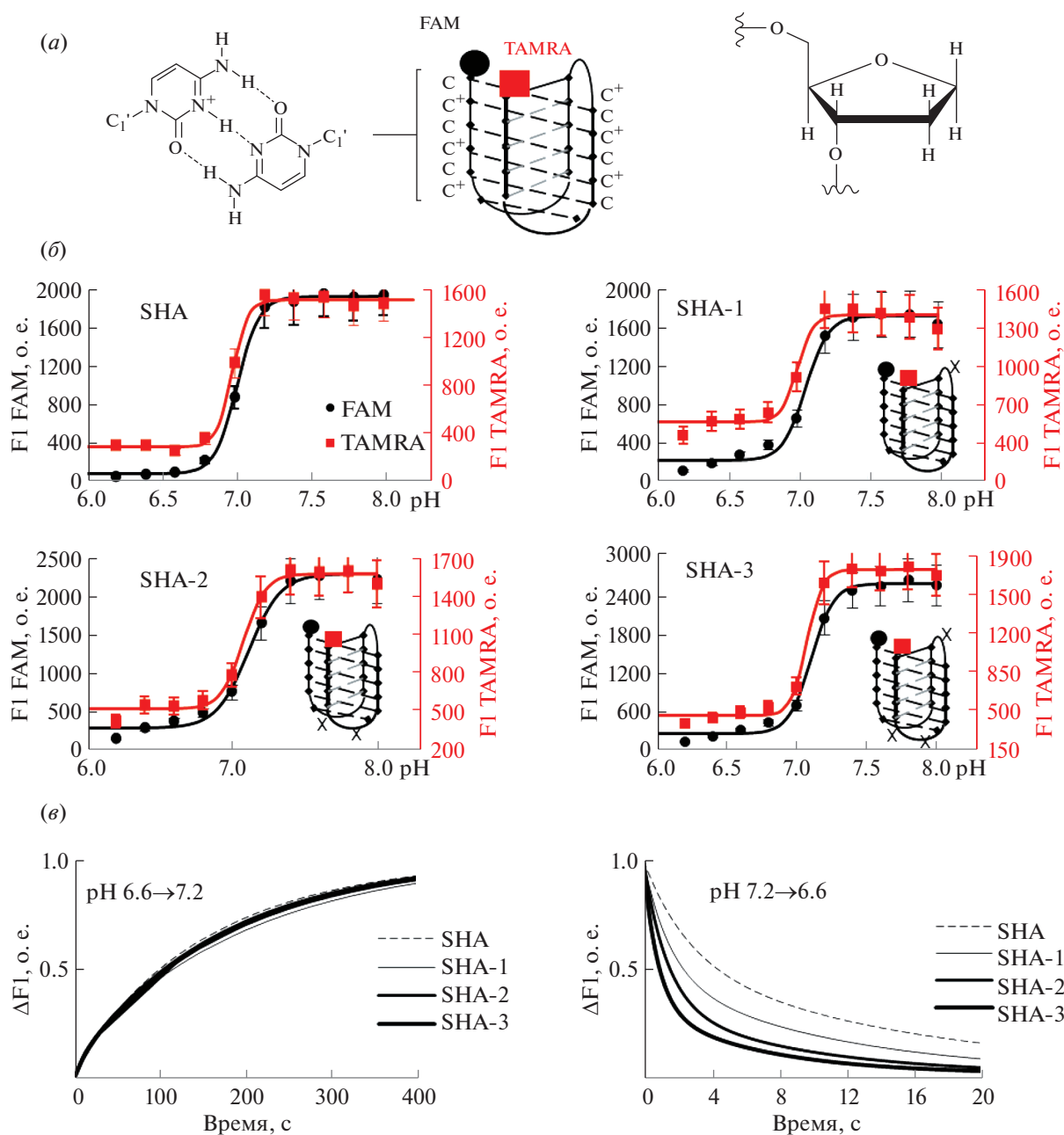


Рис. 1. pH-чувствительность и кинетика формирования/расплетения интеркалированного мотива (iM) SHA из промотора гена *SHANK1* и его аналогов (SHA-1–SHA-3). (a) – Схематическое представление iM и формирующей ядро гемипротонированных цитозиновых пар (слева), а также модификация, вводимая в петлю iM – остаток 1',2'-дидеоксирибозы (справа); (б) – кривые pH-зависимости iM, полученные при регистрации флуоресценции FAM (черный) и TAMRA (красный); (в) – кинетические кривые расплетения (pH 6.6→7.2) и формирования (pH 7.2→6.6) iM, полученные путем регистрации изменений флуоресценции FAM при скачках pH.

буферного раствора на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания), оборудованном модулем остановленного потока, при возбуждении 490 нм с применением фильтра 515 нм. Для определения наблюдаемых констант скорости конформационного перехода экспериментальные кривые аппроксимировали биэкспонентами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние модификации, имитирующей отщепление гетероциклических оснований в петлях iM, на кинетические характеристики и pH-зависимость iM на примере фрагмента промотора гена *SHANK1*. Показано, что модификация существенно ускоряет конформационные переходы, индуцированные малыми изменения-

ми рН. Полученные данные позволяют предположить, что повреждающие ДНК агенты и работа системы репарации облегчают формирование неканонических структур в С-богатых участках. Вторым важным следствием представленных результатов является возможность оптимизации кинетических параметров оптических рН-сенсоров на основе iM: введение остатков дидезоксирибозы в петли позволяет уменьшить время отклика сенсоров, что значимо для исследования протонных токов в клетке. Предложенная модификация может использоваться для получения сенсоров на основе iM, пригодных для исследования быстрых рН-зависимых процессов в клетке.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева (проект № К-2020-024).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wright E.P., Huppert J.L., Waller Z.A.E. // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 2951–2959. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx090>
2. Mir B., Serrano I., Buitrago D., Orozco M., Escaja N., Gonzalez C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. P. 13985–13988. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07383>
3. Turaev A., Isaakova E., Severov V., Bogomazova A., Zaitsepin T., Sardushkin M., Aralov A., Lagarkova M., Pozmogova G., Varizhuk A. // *Biosensors & Bioelectronics.* 2021. V. 175. P. 112864. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112864>
4. Abou Assi H., Garavis M., Gonzalez C., Damha M.J. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 8038–8056. <https://doi.org/10.1093/nar/gky73>
5. Miglietta G., Cogoi S., Pedersen E., Xodo L. // *Sci. Rep.* 2016. V. 5. P. 18097. <https://doi.org/10.1038/srep18097>
6. Niu K., Zhang X., Deng H., Wu F., Ren Y., Xiang H., Zheng S., Liu L., Huang L., Zeng B., Li S., Xia Q., Song Q., Palli S.R., Feng Q. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 1710–1723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1207>
7. Majdi A., Mahmoudi J., Sadigh-Eteghad S., Golzari S.E.J., Sabermarouf B., Reyhani-Rad S. // *J. Neurosci. Res.* 2016. V. 94. P. 879–887. <https://doi.org/10.1002/jnr.23757>

DNA Intercalated Motifs with Non-Nucleoside Inserts

N. A. Petrunina*, V. V. Lebedev**, Yu. G. Kirillova**, A. V. Aralov***, A. M. Varizhuk*, and M. V. Sardukshkin****, #

#Phone: +7 (499) 972-44-38; e-mail: s_makar@mail.ru

*Moscow Institute of Physics and Technology, Institutsky per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

**MIREA – Russian Technological University, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

****Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

A cytosine-rich sequence from the human genome that is presumably involved in the regulation of *SHANK1* gene expression through the formation of an intercalated motif (iM), has been investigated. A modification that imitates base excision in the iM loops was shown to significantly accelerate the conformational transitions induced by small pH changes. These results supplement the understanding of the relation between DNA repair and the formation of noncanonical secondary structures. Moreover, they open up new possibilities in the development of oligonucleotide pH sensors with a fast response.

Keywords: DNA modification, intercalated motifs, kinetics