



УДК 577.151.35:577.113.4:577.2.08

НОВЫЕ 5-АЛКИЛКАРБОКСАМИД-2'-ДЕЗОКСИУРИДИН-5'-ТРИФОСФАТЫ ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО СИНТЕЗА ДНК С ВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ МОДИФИКАЦИИ

© 2019 г. В. А. Василисков*, С. А. Лапа*, В. Е. Кузнецова*, С. А. Суржиков*, В. Е. Шершов*, М. А. Спицын*, **, Т. О. Гусейнов*, **, Р. А. Мифтахов*, **, О. А. Заседателева*, А. В. Лисица***, С. П. Радько**, ***, А. С. Заседателев*, Э. Н. Тимофеев*, А. В. Чудинов*, **, #

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

**ООО "ИБМХ-ЭкоБиоФарм",
Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

***Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
Российской академии медицинских наук, Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Поступила в редакцию 20.12.2018 г.

После доработки 22.12.2018 г.

Принята к публикации 24.12.2018 г.

Осуществлен синтез новых производных трифосфата дезоксиуридина с алкильными группами различной длины, связанными с пиримидиновым основанием *транс*-алкеновым линкером. Исследована эффективность встраивания модифицированных нуклеотидов при синтезе ДНК с высокой степенью модификации в реакции достраивания праймера (primer extension) с Taq-ДНК-полимеразой.

Ключевые слова: модифицированные нуклеотиды, дезоксиуридин, реакция удлинения праймера, SELEX

DOI: 10.1134/S0132342319030060

ВВЕДЕНИЕ

Химически модифицированные 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты представляют значительный интерес в качестве субстратов ДНК-полимераз при направленной селекции ДНК-аптамеров. Технология получения ДНК-аптамеров (SELEX) представляет собой последовательность процедур отбора кандидатов из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов и их последующей амплификации [1, 2]. Интерес к химически модифицированным аптамерам обусловлен их функциональным и структурным разнообразием, улучшающим их аффинные свойства по отношению к молекулярным мишеням [3, 4]. Стадия амплификации предполагает субстратную совместимость модифицированных трифосфатов дезокси-нуклеозидов с используемыми ДНК-

полимеразами. Производные 2'-дезоксииридин-5'-трифосфатов, содержащие в положении 5 электронейтральные амидные фрагменты с гидрофобными заместителями, эффективны при получении аптамеров методом SELEX [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлен синтез новых производных трифосфатов дезоксиуридина (IIIa–г) с алкилкарбоксамидными группами различной длины, связанными с пиримидиновым основанием *транс*-алкеновым линкером. Для синтеза 5-алкилкарбоксамидо-2'-дезоксииридин-5'-трифосфатов (IIIa–г) предварительно получали активированные эфиры карбоновых (пропионовой, масляной, валериановой и капроновой) кислот (IIa–г). Затем конденсацией 5-аминоаллил-2'-дезоксииридин-5'-трифосфата aadUTP (I) и эфиров (IIa–г) получали 5-модифицированные производные dUTP (IIIa–г) [6].

Эффективность ферментативного включения модифицированных нуклеотидов в ДНК исследовали в реакции достраивания праймера (primer extension) с Taq-ДНК-полимеразой [7] на модели

Сокращения: aadUTP – тетралитиевая соль 5-аминоаллил-2'-дезоксииридин-5'-трифосфата; СуЗ – натриевая соль 1-(5-карбокшипентил)-1'-этилиндокарбодиазепинового красителя; DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид; dUTP – 2'-дезоксииридин-5'-трифосфат; NHS – *N*-гидроксисукцинимид; TEAB – триэтиламмоний гидрокарбонатный буферный раствор; THF – тетрагидрофуран.

Автор для связи (тел.: +7 (499) 135-98-00; факс (495) 135-14-05; эл. почта: chud@eimb.ru).

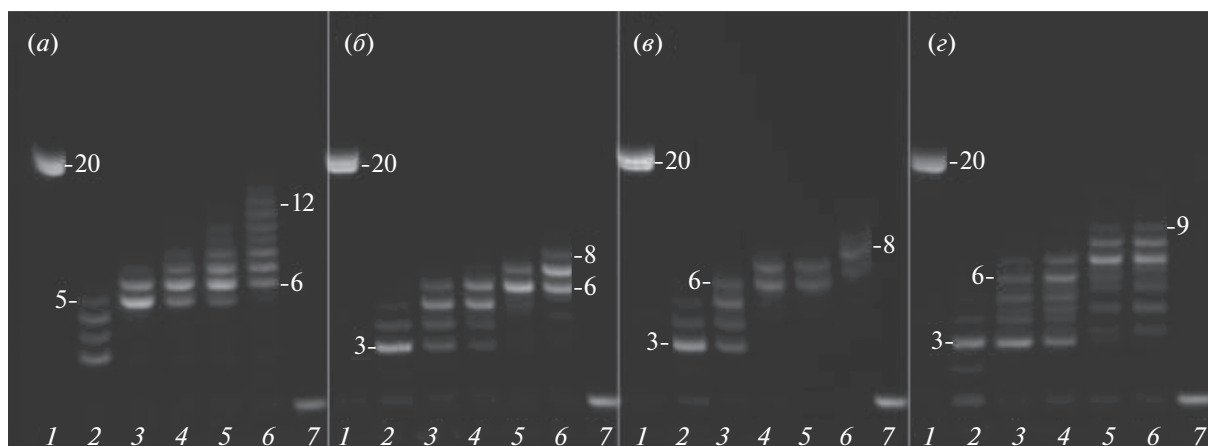


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов реакции удлинения праймера (primer extension) с 5-алкиламидными производными dUTP (**IIIa-r**) (соответственно рисунки (a)–(d)) при реакции с Taq-ДНК-полимеразой в течение 5 (2) и 30 мин (3); 1 (4); 2 (5) и 4 ч (6). Денатурирующий полиакриламидный гель (20%-й, соотношение акриламид–бисакриламид, 19 : 1), 50°C, регистрация в диапазоне флуоресценции красителя Су3, на электрофореграмме сделаны пометки числа достроившихся модифицированных нуклеотидов. Дорожка: 1 – контроль с dTTP, 1 ч; дорожка 7 – праймер.

М-Р (см. экспериментальную часть). Полученные результаты представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, для всех модифицированных нуклеотидов (**IIIa-r**) обнаруживается смесь ДНК-продуктов различной длины. С увеличением времени инкубирования с 5 мин до 4 ч возрастает количество встроившихся нуклеотидов и, соответственно, максимальная длина достроенного праймера. Каждый из исследованных трифосфатов (**IIIa-r**) включает в синтезируемую ДНК подряд не менее 5 модифицированных нуклеотидов подряд: для производных dUTP (**IIIa**) – до 12, для (**IIIb**) – до 8, что является вполне достаточным для получения аптамеров методом SELEX. Использование производных dUTP (**IIIa-r**) даст возможность повысить аффинность получаемых аптамеров благодаря гидрофобным взаимодействиям алифатических цепей и водородным связям амидных групп с белковой мишенью [8, 9].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

N-Гидроксисукцинимидные эфиры (**IIa-r**) получали реакцией карбоновой кислоты (1 ммоль), NHS (1 ммоль) и DCC (1 ммоль) в THF при 5°C с выходом ~70%. 5-Алкилкарбоксамидо-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфаты (**IIIa-r**) синтезировали реакцией aadUTP (**I**) и эфиров (**IIa-r**) в смеси DMF и 0.1 М карбонат-бикарбонатного буферного раствора (pH 9.2), согласно предложенной нами методике [6]. Трифосфаты (**IIIa-r**) очищали колоночной анионообменной хроматографией на DE-52 в 20% ацетонитриле с линейным

градиентом концентраций TEAB от 0 до 0.4 М и затем обращенно-фазовой хроматографией на C18-RP в градиенте концентраций ацетонитрила от 0 до 30% в 0.1 М TEAB с УФ-контролем на 280 нм. Выход 5-производных dUTP (**IIIa-r**) составил ~50–60%. Соединения охарактеризованы методом ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектроскопии.

Реакцию достраивания праймера проводили с использованием матрицы М и праймера Р (приведены последовательности 5'-3'): (М): (A)₂₀-TTG-TCA-CTC-AGA-CCA-ACT-CCC-T-NH₂; (Р): Су3-A-GGG-AGT-TGG-TCT-GAG-TGA-CAA. Матрица М содержит аминогруппу на 3'-конце для блокирования трансферазной активности Taq-ДНК-полимеразы [10]. Праймер Р маркирован по 5'-концу флуоресцентным красителем Су3. Реакцию достраивания праймера проводили в реакционной смеси (25 мкл), содержащей 5 мкМ праймер, 5 мкМ матрицу, dCTP, dATP, dGTP и dTTP (или один из модифицированных dUTP (**IIIa-r**)) в концентрации 200 мкМ и Taq-ДНК-полимеразу (Sileks, Москва) в количестве 5 ед. акт. в рекомендованном производителем буфере при температуре 72°C. Время элонгации варьировали от 5 мин до 4 ч. Продукт реакции выделяли и анализировали методом электрофореза в денатурирующих условиях. Изображение геля получали в диапазоне флуоресценции красителя Су3 с возбуждением при 535 нм и регистрацией при 580 нм.

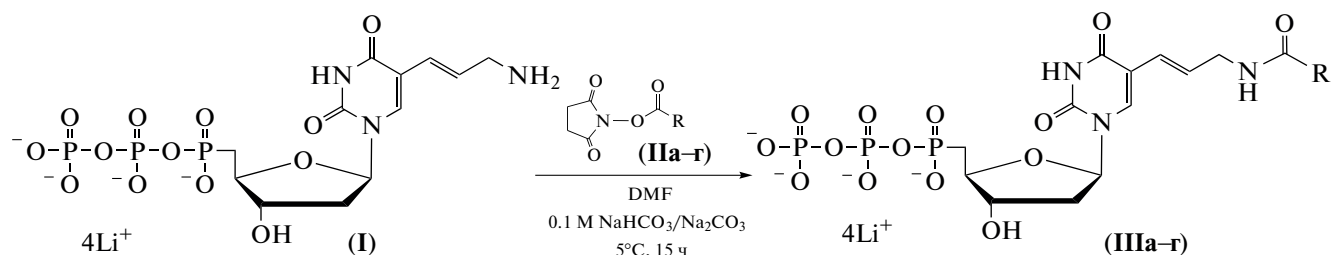


Схема 1. Схема синтеза 5-алкилкарбоксамидо-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфатов (III): (а) R = C₂H₅; (б) R = *n*-C₃H₇; (в) R = *n*-C₄H₉; (г) R = *n*-C₅H₁₁.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования “Геном”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096). В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования “Геном”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tuerk C., Gold L. // *Science*. 1990. V. 249. P. 505–510.
2. Ellington A.D., Szostak J.W. // *Nature*. 1990. V. 346. P. 818–822.
3. Latham J.A., Johnson R., Toole J.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 2817–2822.
4. Brody E.N., Gold L. // *J. Biotechnol.* 2000. V. 74. P. 5–13.
5. Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. // *Mol. Biotechnology*. 2016. V. 58. P. 79–92.
6. Чудинов А.В., Киселева Я.Ю., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Лана С.А., Тимофеев Э.Н., Арчаков А.И., Лисица А.В., Радько С.П., Заседателев А.С. // *Мол. биология*. 2017. Т. 51. С. 534–544.
7. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. e73.
8. Davies D.R., Gelin A.G., Zhang C., Rohloff J.C., Carter J.D., O’Connell D., Waugh S.M., Wolk S.K., Mayfield W.S., Burgin A.B., Edwards T.E., Stewart L.J., Gold L., Janjic N., Jarvis T.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. 19971–19976.
9. Vaught J.D., Bock C., Carter J., Fitzwater T., Otis M., Schneider D., Rolando J., Waugh S., Wilcox S.K., Eaton B.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 4141–4151.
10. Smirnov I.P., Kolganova N.A., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 6674.

Novel 5-Alkylcarboxamide-2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphates for Enzymatic Synthesis of High-Modified DNA

V. A. Vasiliskov*, S. A. Lapa*, V. E. Kuznetsova*, S. A. Surzhikov*, V. E. Shershov*, M. A. Spitsyn*, **, T. O. Guseinov*, **, R. A. Miftahov*, O. A. Zasedateleva*, A. V. Lisitsa***, S. P. Radko**, ***, A. S. Zasedatelev*, E. N. Timofeev*, and A. V. Chudinov*, **, #

*Phone: +7(499)135-98-00; fax: +7(495)135-14-05; e-mail: chud@eimb.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**IBMC-EcoBioPharm Ltd., ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

***Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10, Moscow 119121 Russia

Here we describe the synthesis of deoxyuridine triphosphate derivatives with alkyl groups of various sizes attached to pyrimidine base through the trans-alkene linker. Using Taq DNA-polymerase, these derivatives were incorporated into the single-stranded DNA by primer extension method, thus, achieving a high degree of DNA modification.

Keywords: modified nucleotides, deoxyuridine, primer extension, SELEX