



УДК 547.963.32.057:542.95

© 1994 Н. Ф. Крынецкая, О. А. Чеботарь, Х. К. Х. Ибрагим,
Е. А. Романова, В. Н. Ташлицкий, Т. С. Орецкая,
Н. И. Соколова*, З. А. Шабарова

АНТИСЕНСОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ПО
3'- И 5'-КОНЦАМ
1-(β -D-2'-ДЕЗОКСИ-ТРЕО-ПЕНТОФУРАНОЗИЛ)ТИМИН

*Химический факультет и * НИИ физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Ключевые слова: олигонуклеотиды модифицированные, гидролитическая устойчивость; 1-(β -D-2'-дезоксигрибонуклеозид)тимин.

Автоматическим амидофосфитным методом получены 13—14-звенные олигонуклеотиды, содержащие 1-(β -D-2'-дезоксигрибонуклеозид)тимин (хТ). Показано, что введение остатка хТ по 3'- и 5'-концам олигонуклеотидов замедляет их гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда и ферментами сыворотки крови; модифицированные таким образом олигонуклеотиды образуют стабильные дуплексы как с комплементарными ДНК-, так и с РНК-матрицами. Обнаружено, что олигодезоксирибонуклеотиды с 3'- и 5'-концевыми остатками хТ формируют с комплементарным участком РНК субстраты для РНКазы Н, причем использование таких модифицированных зондов практически не влияет на эффективность гидролиза РНК, катализируемого РНКазой Н.

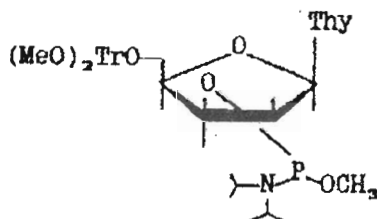
В последние годы антисенсовые олигонуклеотиды начали использоваться в диагностических и терапевтических целях. Одной из проблем, возникающих при этом, является гидролиз олигонуклеотидов при действии на них клеточных нуклеаз. Наиболее часто используемый подход к ее решению — предотвращающая гидролиз химическая модификация олигомеров. Описанные в литературе способы модификации олигонуклеотидов могут быть разделены на две основные группы: модификация 3'- и 5'-концевых и модификация межнуклеотидных фосфатных групп. Ко второй группе относится синтез метилфосфонатных [1, 2] и тиофосфонатных [3] аналогов олигонуклеотидов. Оба типа описанных выше модифицированных зондов, устойчивых к клеточным нуклеазам, как правило, включают введение в олигонуклеотиды чужеродных химических группировок. Перспективным классом нуклеазоустойчивых олигомеров являются олигонуклеотиды, содер-

Используемые сокращения: хТ, ксилотимидин — 1-(β -D-2'-дезоксигрибонуклеозид)тимин. Префикс «d» (дезоксигрибонуклеозидов и олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

жащие α -аномеры нуклеозидов, однако синтез последних — самостоятельная задача [4].

В настоящей работе предложен новый тип антисенсовых олигонуклеотидов, устойчивых к действию экзонуклеаз: олигомеры, содержащие по 3'- и 5'-концам цепи 1-(β -D-2'-дезокситреопентофуранозил)тимин (*ксило*-тимидин), отличающийся от природного тимидина обращением конфигурации при атоме C3'. Такие олигомеры могут быть получены прямым автоматическим синтезом лишь с незначительным изменением регламента синтетического цикла. Основанием для создания и изучения такого типа модифицированных олигонуклеотидов послужили полученные нами ранее данные о повышенной экзонуклеазной устойчивости динуклеозидфосфатов, содержащих сахара с инвертированной конфигурацией гидроксильных групп при 2'- или 3'-атомах углерода [5].

Целью данной работы явилось получение 3'-амидофосфитного производного защищенного модифицированного нуклеозида xT и последующее встраивание его в олигодезоксирибонуклеотиды в ходе автоматического синтеза:



Автоматический синтез олигонуклеотидов по амидофосфитной схеме с единичной заменой природного нуклеозида на xT описан нами ранее [6]. В настоящей работе представлен синтез и изучены некоторые свойства четырех модифицированных олигонуклеотидов (I—IV), содержащих множественные включения xT на обоих концах олигомерной цепи.

xTCACTTCTGAGxTT	(I)	CACTTCTGAG	(V)
xTCACTTCTGAGxTxTA	(II)	ACCACCGCGCT	(VI)
xTACCACCGCGCxTA	(III)		
xTACCACCGCGCxTxTC	(IV)		

Первичная структура олигонуклеотидов была подтверждена секвенированием по методу Максама — Гилберта [7]. Модифицированные звенья (xT) «прочитываются» как тимидин. В жестких условиях (высокая концентрация фермента, 16 ч, 50° С) удалось гидролизовать модифицированные олигонуклеотиды до нуклеозидов и сравнением гидролизата с контрольной смесью нуклеозидов с помощью ВЭЖХ подтвердить нуклеозидный состав.

Полученные олигонуклеотиды комплементарны двум различным одноцепочечным участкам 5S РНК рибосомы *E. coli* [8]. В связи с этим на модельной системе фрагменты 5S РНК — олигонуклеотид можно оценить влияние концевых модификаций на термическую устойчивость гибридных дуплексов, а также на эффективность действия РНКазы H, механизм функционирования которой интенсивно изучается нами в последние годы [9, 10]. В контрольных экспериментах использованы немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды (V) и (VI).

Предварительно было изучено влияние концевых xT-звеньев в динуклеозидфосфатах на устойчивость к действию фосфодиэстеразы (ФДЭ) змеиного яда для серии модифицированных динуклеозидфосфатов, содержащих остаток xT на 5'-конце (табл. 1) (продукты гидролиза разделяли с помощью ТСХ), причем оказалось, что такие производные гидролизуются медленнее, чем немодифицированные. Так, через 3 ч динуклеозидфосфат ТрА обнаружить в реакционной смеси не удастся, в то время как 40% xТрА остается без изменений.

Закономерности гидролиза ФДЭ змеиного яда изучались также на примере

Степень гидролиза модифицированных динуклеозидфосфатов в присутствии ФДЭ змеиного яда

Динуклеозидфосфат	Степень гидролиза, %	
	1 ч	3 ч
ТрА	70	100
хТрА	50	60
хТрГ	60	60

Таблица 2

Степень гидролиза модифицированных олигонуклеотидов в присутствии экзонуклеаз

Олигонуклеотид	ФДЭ змеиного яда		Олигонуклеотид	Сыворотка крови	
	Время гидролиза, ч	Степень гидролиза, %		Время гидролиза, ч	Степень гидролиза, %
(II)	0	0	(I)	0	0
	0,5	0		3	45
	1	3			
	2	5			
	3	8			
	5	12			
(III)	0	0	(II)	0	0
	0,5	3		3	0
	1	13			
	2	15			
	3	18			
	5	21			
(V)	0	0	(VI)	0	0
	0,5	100		3	100

соединений (II) и (III), различающихся нуклеотидной последовательностью и количеством хТ-звеньев на 3'-конце олигомеров (табл. 2). В качестве контроля использовали немодифицированный декануклеотид (V). Ферментативный гидролиз проводили по стандартной методике при pH 8,5 и 37° С, анализируя через 1, 2, 3 и 5 ч состав реакционной смеси методом ион-парной ВЭЖХ. Количественные характеристики гидролиза определяли по соотношению площади пика гидролизующего соединения и пика внутреннего стандарта, в качестве которого использовался уридин-5'-фосфат.

Кроме того, нуклеазная стабильность соединений (I) и (II) в сравнении с немодифицированным олигонуклеотидом (VI) (табл. 2) была изучена с использованием ферментов сыворотки крови. Степень гидролиза определяли методом ВЭЖХ, как указано выше, но в качестве внутреннего стандарта использовали уридин. Как видно из приведенных данных, даже через 5 ч после начала реакции модифицированные олигонуклеотиды (II) и (III) расщепляются ФДЭ змеиного яда в незначительной степени, тогда как их немодифицированные аналоги (V) и (VI) уже за 30 мин гидролизуются полностью. хТ-Содержащие олигомеры (I) и (II) достаточно устойчивы в присутствии ферментов сыворотки крови. Так, за 3 ч соединение (I) гидролизуеться на 45%, соединение (II) остается без изменений, в то время как контрольный олигонуклеотид (VI) за это время расщеплялся полностью. Следует отметить, что к действию экзонуклеаз более

устойчив олигонуклеотид (II), содержащий на 3'-конце два модифицированных звена. Следовательно, введение двух подряд звеньев xT по 3'-концу олигомера значительно повышает нуклеазную устойчивость соответствующих олигомеров.

Таблица 3

Структура и термическая устойчивость модифицированных дуплексов ($C_0 = 3 \text{ мкМ}$)

Номер дуплекса	Структура	$T_{\text{пл}}, ^\circ\text{C}$
1	5' A-АСТСАГААГТГ-А 3' ТхТГАГТСТТСАСхТ	45
2	5' A-АСТСАГААГТГ-А 3' АхТхТГАГТСТТСАСхТ	42
3	5' ААСТСАГААГТГА 3' ТТГАГТСТТСАСТ	48
4	5' GTG-AGCGCGGTGGT-CC 3' АхТCGCGCCACCAхТ	62
5	5' GTG-AGCGCGGTGGT-CC 3' СхТхТCGCGCCACCAхТ	62
6	5' GTGAGCGCGGTGGTCC 3' ТCGCGCCACCA	65
7	5' r(pppGGGAGGCCG-U-AGCGCGGUGGU-C ₂ Ac ₂) 3' CхТхТCGCGCCACCAхТ	69
8	5' r(GGGTAGCGCGGTGGTCC) 3' ТCGCGCCACCA	71

Применение антисенсовых олигонуклеотидов предполагает образование устойчивых дуплексов с мишенями. В случае синтезированных нами олигомеров, содержащих остатки хТ по обоим концам олигомерной цепи, возможна некомплементарность концевых модифицированных звеньев по отношению к ДНК- или РНК-мишени. Поэтому было определено влияние этих модификаций на термическую устойчивость соответствующих дуплексов (табл. 3) и установлено, что все модифицированные олигонуклеотидные зонды образуют устойчивые дуплексы как с ДНК-матрицами (дуплексы 1, 2, 4, 5), так и с РНК-матрицей (дуплекс 7).

Экспериментально показано, что величины температур плавления дуплексов довольно близки между собой. Наблюдаемое незначительное (2—6° C) понижение температуры плавления модифицированных дуплексов (1, 2, 4, 5, 7) в сравнении с немодифицированными (3, 6 и 8) обусловлено, вероятно, дестабилизацией, вносимой некомплементарными концами и ослабленным взаимодействием между хТ и А.

Известно, что гибридные РНК-ДНК-дуплексы термодинамически более устойчивы, чем ДНК-ДНК-дуплексы [11], эта закономерность проявляется и для модифицированных гибридных дуплексов (см. табл. 3): гибридный дуплекс (7), образованный модифицированным олигодезоксинуклеотидом (IV) и 27-звенной *рибо*-матрицей, довольно устойчив, введение по концам *ксило*-тимидина не оказывает значительного дестабилизирующего влияния на термодинамическую ус-

тойчивость. Значение температуры плавления дуплекса (7) выше, чем для его дезокси-аналога, дуплекса (5).

Центральное место в процессах подавления трансляции мРНК с помощью антисенсовых олигонуклеотидов занимает образование гибридного дуплекса олигодезоксирибонуклеотида с мРНК и последующий гидролиз РНК рибонуклеазой Н (РНКазой Н). Такой гибридный дуплекс может быть получен добавлением синтетического олигодезоксирибонуклеотида к нативной РНК. Поэтому важно было выяснить, будут ли олигонуклеотиды, содержащие по концам *ксило*-тимидин, формировать с РНК субстрат для РНКазы Н.

В присутствии олигонуклеотидных зондов (I—VI) проводили гидролиз 5S РНК рибосом *E. coli*, катализируемый РНКазой Н *E. coli* по стандартной методике [10] при 20° С в течение 1 ч. Было показано, что во всех исследуемых случаях происходит эффективное расщепление 5S РНК, т. е. включение в зонд модификаций не оказывает влияния на каталитическую активность фермента.

Таким образом, введение в олигодезоксирибонуклеотиды по 5'- и 3'-концам *ксило*-тимидиновых звеньев способствует значительной стабилизации соответствующих олигонуклеотидов по отношению к экзонуклеазам, не мешает образованию прочных дуплексов с комплементарными участками мишеней и не снижает эффективности работы РНКазы Н. Олигонуклеотиды, содержащие предложенные концевые модификации, могут рассматриваться как новый класс антисенсовых олигомеров.

Экспериментальная часть

В работе использовали 5'-О-диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламида)-β-цианэтилфосфиты 2'-деоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США), тимидин (Fluka, Швейцария), щелочную фосфатазу (926 ед. акт./мг) и фосфодиэстеразу змеиного яда (2,38 ед. акт./мг) (Serva, Германия). Рибонуклеаза Н *E. coli* (РНКазы Н) (4,05 мг/мл) любезно предоставлена д-ром С. Канайя (Институт инженерии белка, Осака, Япония), сыворотка крови — Е. А. Скрипкиным (МГУ).

5S РНК рибосом *E. coli* выделяли из 50S рибосомных частиц (НПО «Биолар») [11], бис(*N,N*-диизопропиламида)метилфосфит был получен по методике [12].

Олигорибонуклеотид, входящий в состав гибридного дуплекса (6), был получен А. А. Еловым (МГУ) методом транскрипции с помощью Т7-РНК-полимеразы и любезно предоставлен для работы.

5'-О-Диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламида)метилфосфит 1-(β-*D*-2'-дезокситреопентофуранозил)тимина получали из тимидина как описано нами в работе [6].

Олигонуклеотидный синтез природных (V и VI) и модифицированных олигонуклеотидов выполняли на автоматическом ген-синтезаторе Applied Biosystems 380В (США). В качестве полимерного носителя использовали Small Scale dNCPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым нуклеозидным звеном 20-24 мкмоль/г.

Удаление защитных групп после синтеза олигонуклеотидов осуществляли как описано ранее [10].

Кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном термостатированным кюветодержателем и блоком для измерения температуры, при непрерывном повышении температуры со скоростью 1° С/мин (длина оптического пути 1 см).

Электрофорез олигонуклеотидов проводили в 15% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. Аналитические пробы олигонуклеотидов наносили в ячейку геля в 5 мкл раствора красителей-маркеров ксиленицианола (ХС) и бромфенолового синего (ВРВ) в 80% формамиде. Положение соединений определяли после прокрашивания геля раствором бромистого этидия.

ТСХ проводили на пластинках Cellulose F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системе пропанол — аммиак — вода (6:1:2).

Анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов проводили с использованием хроматографических колонок размером 4×250 мм; носитель — Диасорб С16Т (7 мкм, «Элсико», Россия). Обращенно-фазовую хроматографию олигонуклеотидов, содержащих диметокситритильную группу, осуществляли на хроматографе Altex (США) (градиент концентрации (0—40%, 60 мин) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (рН 6,5), скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

После удаления диметокситритильной группы олигонуклеотиды анализировали повторно обращенно-фазовой и ион-парной ВЭЖХ. Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографе Трасог (Голландия) (градиент концентрации (0—40%, 80 мин) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (рН 6,5), скорость элюции 1 мл/мин, 45° С). Ион-парную хроматографию осуществляли на приборе Waters (США) (градиент концентрации (5—40%) ацетонитрила в 48 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7), содержащем 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламмония, скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

Определение нуклеозидного состава. 0,2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида растворяли в 6 мкл 0,2 М трис-НСl-буфера, содержащего 0,04 М MgCl₂ (рН 8,5), добавляли 2 мкл щелочной фосфатазы ($0,26 \cdot 10^{-3}$ ед. акт./мкл) и 2 мкл фосфодиэстеразы змеиного яда ($0,48 \cdot 10^{-2}$ ед. акт./мкл). Реакционную смесь инкубировали в течение 16 ч при 50° С. Продукт гидролиза анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Altex (США) (градиент концентрации (0—12%, 40 мин) ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (рН 6,5), скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

Гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда. 0,2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида (I—IV) и 0,1 ОЕ₂₆₀ уридин-5'-фосфата растворяли в 0,2 М трис-НСl, рН 8,5, содержащем 0,04 М MgCl₂ (8 мкл). После добавления 2 мкл раствора ФДЭ змеиного яда ($0,48 \cdot 10^{-2}$ ед. акт./мкл) смесь инкубировали при 37° С, отбирая через 1, 2, 3 и 5 ч алиquotы реакционной смеси и анализируя состав методом ион-парной ВЭЖХ.

Гидролиз олигонуклеотидов ферментами сыворотки крови. 0,1 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида растворяли в 10 мкл неразведенной сыворотки крови, добавляли 0,1 ОЕ₂₆₀ уридина и инкубировали при 37° С, отбирая через 1, 2, 3 и 5 ч алиquotы реакционной смеси. Перед анализом состава реакционной смеси методом ион-парной ВЭЖХ к алиquotе добавляли 50 мкл 1 М раствора ацетата натрия, экстрагировали фенолом (3×100 мкл), экстракт промывали эфиром (3×100 мкл).

Гидролиз РНК рибонуклеазой Н. Реакционная смесь (10 мкл) содержала: 0,03 ОЕ₂₆₀ 5S РНК рибосом *E. coli*, 0,03 ОЕ₂₆₀ олигодезоксирибонуклеотида (I—VI), 0,01 М трис-НСl (рН 8,5), 0,011 М MgCl₂, 0,5 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 1 мкл РНКазы Н (35 ед. акт./мкл). Смесь выдерживали 1 ч при 20° С, добавляли 5 мкл 3 М натрий-ацетатного буфера (рН 5,5) и обрабатывали 75 мкл этанола. Продукты гидролиза анализировали гель-электрофорезом.

Авторы выражают благодарность д-ру С. Канаёя (Институт инженерии белка, Осака, Япония) за предоставленную РНКазу Н и А. А. Елову (химический факультет МГУ) за рибоолигонуклеотиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agrawal S., Mayrand S. H., Zamecnic P. C., Pederson T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 1401—1405.
2. Giles R. V., Tidd D. M. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 4. P. 763—770.
3. Stein C. A., Neckers L. M., Nair B. C., Mumbauer S., Hoke G., Pal R. // J. Acquired Immune Deficiency Syndromes. 1991. V. 4. P. 686—693.
4. Bertrand J.-R., Imbach J.-L., Paoletti C., Malvy C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1989. V. 164. № 1. P. 311—388.
5. Соколова Н. И., Крынецкая Н. Ф., Суханова Л. Л., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 379—385.

6. Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орецкая Т. С., Лопанов В. К., Шабарова З. А.//Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034—1039.
7. Махат А. М., Gilbert W.//Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
8. Goriger H. U., Szykowiak C., Wagner R.//Eur. J. Biochem. 1984. V. 144. P. 25—34.
9. Метелев В. Г., Крынецкая Н. Ф., Пурмаль А. А., Шабарова З. А.//Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 4. С. 507—513.
10. Шмидт С., Кузнецова Л. Г., Романова Е. А., Ниманн А., Орецкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А.//Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 823—830.
11. Крынецкая Н. Ф., Сухомлинов В. В., Рейнтамм Т. Г., Метелев В. Г., Шабарова З. А.//Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1990. Т. 31. № 3. С. 305—309.
12. Varone A. P., Tang J. U., Caruthers M. N.//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.

Поступила в редакцию
2.VII.1993

*N. F. Krynetskaya, O. A. Chebotar, H. K. H. Ibrahim,
E. A. Romanova, V. N. Tashlitsky, T. S. Oretskaya,
N. I. Sokolova*, Z. A. Shabarova*

**ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES WITH 3'- AND 5'-TERMINAL
1-(β -D-2'-DEOXY-THREO-PENTAFURANOSYL)THYMIN**

*Department of Chemistry and *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical
Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Oligonucleotides with 3'- and 5'-terminal 1-(β -D-2'-deoxy-threo-pentafuranosyl)thymin residues (inversion at C3'-atom) were obtained by the automatic phosphoramidite synthesis. The modifications protect oligonucleotides from the nuclease degradation and do not affect the stability of nucleic acid duplexes.