



УДК 547.963.32:577.113.4

## 2'-АЛЬДЕГИДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ. СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ ДНК-УЗНАЮЩИХ БЕЛКОВ

© 2010 г. Е. А. Хомякова\*, Е. В. Казанова\*\*, Е. М. Зубин\*, Е. А. Кубарева\*\*,  
Н. В. Молочков\*\*\*, Е. М. Рязанова\*\*\*\*, Т. С. Орецкая\*

\*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Воробьевы горы, 1;

\*\*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;

\*\*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пущино;

\*\*\*\*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Москва

Поступила в редакцию 27.10.2009 г. Принята к печати 03.11.2009 г.

Олигонуклеотиды, содержащие в своем составе 1,2-диольную группу, синтезированы с использованием 3'-амидофосфита 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина. Изучена термическая стабильность модифицированных ДНК-дуплексов. Исследован характер их комплексообразования с субъединицей р50 фактора транскрипции NF-κB и C5-цитозиновой ДНК-метилтрансферазой M.SsoII. Окисление 1,2-диольной группы олигонуклеотидов периодатом натрия позволяет получать реакционноспособные 2'-альдегидные производные. Изучена возможность их использования для аффинной модификации ДНК-узнающих белков.

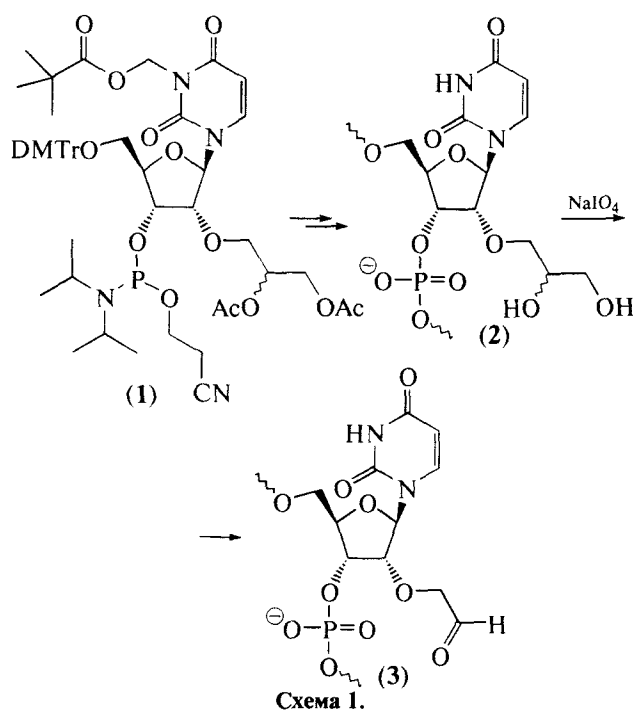
*Ключевые слова:* модифицированные олигонуклеотиды, ДНК-белковые взаимодействия, аффинная модификация.

### ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные олигонуклеотиды широко используются в молекулярной биологии и медицинской диагностике, так как обладают уникальной способностью регулировать экспрессию генов, избирательно связываясь с комплементарными последовательностями ДНК, РНК и белками.

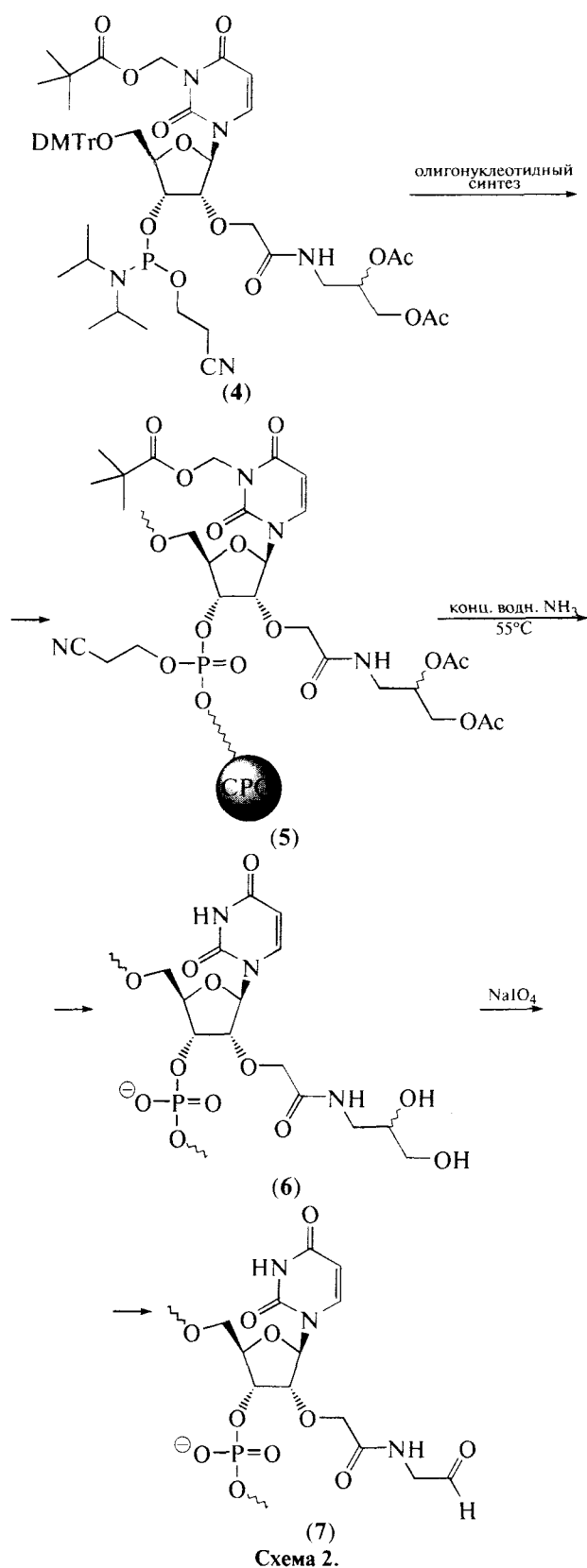
Одним из направлений исследований в химии нуклеиновых кислот является разработка методов синтеза олигонуклеотидов, содержащих в своем составе химически активные группировки [1, 2]. Реакционноспособные производные могут использоваться для исследования белково-нуклеиновых взаимодействий методом аффинной модификации [1, 2]. В рамках этого подхода ранее нами был разработан метод получения олигонуклеотидов, содержащих в 2'-положении углеводного фрагмента альдегидную группу [3]. Для этой цели в олигомерную цепь в процессе автоматического твердофазного синтеза встраивают соединение-предшественник, содержащее 1,2-диольную группировку, которую в дальнейшем окисляют до альдегида перио-

датом натрия (схема 1). В работе [4] нами был опубликован метод синтеза нового 3'-амидофосфита модифицированного уридина, содержащего в своем составе 1,2-диольный фрагмент (схема 2). В таком варианте линкер, соединяющий O2'-положение нуклеозида и 1,2-диол, на три атома длиннее, чем в случае 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридина (схема 1).



Сокращения: DMTr – 4,4'-диметокситритил; U<sup>dao</sup> – 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридин; U<sup>d</sup> – 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридин; U<sup>dap</sup> – 2'-O-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридин; U<sup>o</sup> – 2'-O-(2-оксоэтил)уридин; X – остаток 2-(4-аминобутил)пропан-1,3-диола; MALDI-TOF-MS – времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбционной ионизацией; M.SsoII – C5-цитозиновая ДНК-метилтрансфераза SsoII.

\* Автор для связи (тел.: (495) 939-31-48; факс: (495) 939-31-81; эл. почта: evkazanova@mail.ru).



Взаимодействие ε-аминогруппы остатков лизина белка с 2'-альдегидной группой в модифицированной ДНК приводит к образованию основания

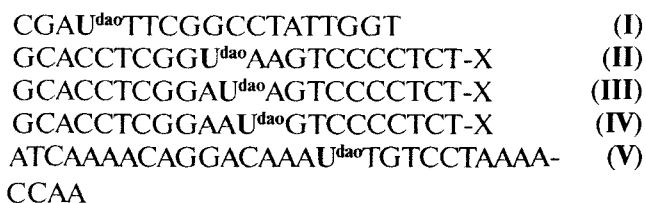
Шиффа, которое затем восстанавливают до вторичного амина цианборгидридом натрия. В ряде предыдущих работ [5–8] была исследована возможность использования 2'-оксоэтильных олигонуклеотидов для аффинной модификации фактора транскрипции NF-κB, эндонуклеазы рестрикции SsoII, метилтрансферазы SsoII и интегразы ВИЧ-1.

В настоящей работе впервые изучено взаимодействие производных ДНК, содержащих в своем составе остатки 2'-O-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридина, с субъединицей p50 фактора транскрипции NF-κB и ДНК-метилтрансферазой SsoII.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез 3'-амидофосфита (4) описан нами в работе [4]. Данный подход обладает рядом преимуществ по сравнению с методом, опубликованным ранее [3]. К ним можно отнести меньшее количество стадий, более высокий общий выход конечного продукта, применение менее дорогих реагентов, а также отсутствие необходимости использовать токсичный оксид осмия OsO<sub>4</sub>.

3'-Амидофосфит (4) использовали в автоматическом твердофазном олигонуклеотидном синтезе (схема 2). Нами были синтезированы модифицированные олигонуклеотиды (I)–(V), содержащие остатки 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина (U<sup>dao</sup>) (5' → 3'):



Олигонуклеотиды (II)–(IV) содержат в своем составе 3'-концевой аминоксильный линкер X. Предполагалось, что дуплексы, содержащие данные олигомеры, будут использованы для изучения их взаимодействия с белками ядерных экстрактов клеток. Из литературы [9] известно, что встраивание аминоксильных остатков на 3'-конец олигомерной цепи препятствует действию 3'-экзонуклеаз.

Окисление 1,2-диолевой группировки в составе олигонуклеотидов проводили под действием периодата натрия (схема 2). Наличие альдегидной группы демонстрировали с помощью реакции с дигидразидом янтарной кислоты с последующим восстановлением образовавшегося гидразона цианборгидридом натрия (схема 3) [4]. Строение продукта реакции подтверждали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF.

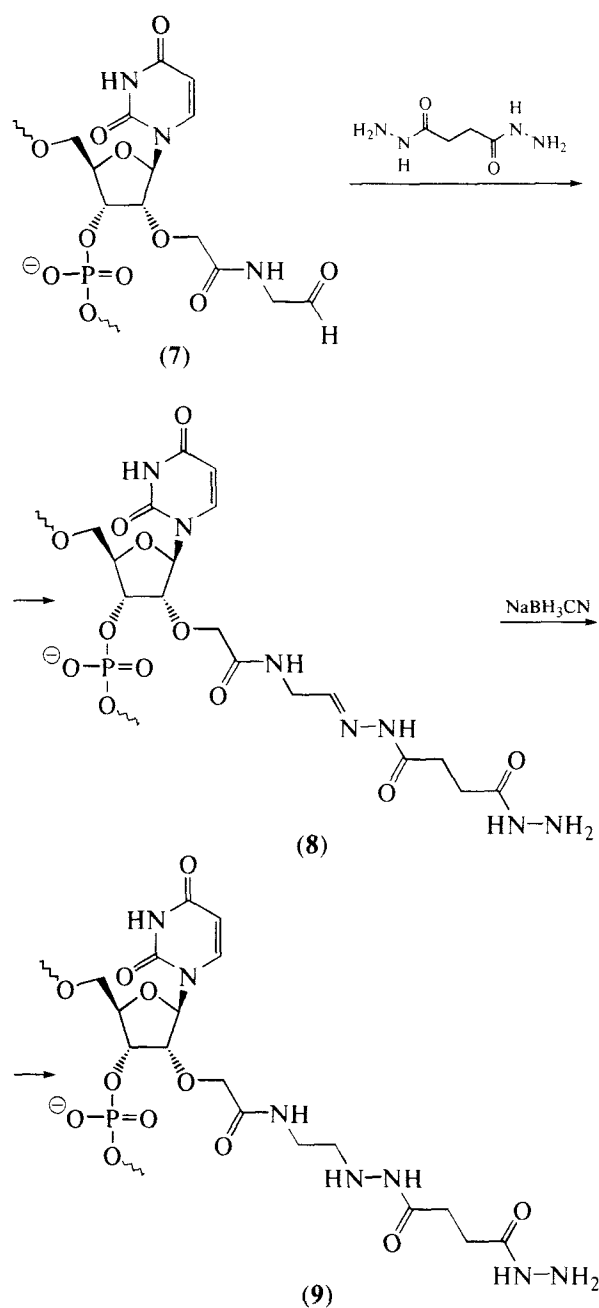


Схема 3.

Термическую стабильность дуплексов, образованных модифицированными олигонуклеотидами и комплементарными им ДНК-матрицами, изучали по изменению флуоресценции красителя SYBR Green I (табл. 1). Введение в состав олигонуклеотидов остатка 2'-*O*-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина не вызывает заметной дестабилизации ДНК-дуплексов. Температура плавления дуплексов меняется в пределах 3°C. Эти результаты согласуются с литературными данными [9, 10] по изучению термической стабильности ДНК-дуплексов, содержащих остатки 2'-*O*-алкилнуклеозидов. Отметим, что наличие 3'-концевого аминоконца

Таблица 1. Температуры плавления ДНК-дуплексов

Шифр	ДНК-дуплекс (5' → 3'/3' → 5')	T <sub>пл</sub> , °C (±1)
A	GCACCTCGGTAAGTCCCCTCT GAGCCATTCAGGGGAGATG	73
B	GCACCTCGGTAAGTCCCCTCT-X X-GAGCCATTCAGGGGAGATG	73
C (II)	GCACCTCGGU <sup>dao</sup> AAGTCCCCTCT-X X-GAGCCA...TTCAGGGGAGATG	71
D	GCACCTCGGATAGTCCCCTCT GAGCCTATCAGGGGAGATG	71
E	GCACCTCGGATAGTCCCCTCT-X X-GAGCCTATCAGGGGAGATG	72
F (III)	GCACCTCGGAU <sup>dao</sup> AGTCCCCTCT-X X-GAGCCTA...TCAGGGGAGATG	70
G	GCACCTCGGAATGTCCCCTCT GAGCCTTACAGGGGAGATG	73
H	GCACCTCGGAATGTCCCCTCT-X X-GAGCCTTACAGGGGAGATG	73
I (IV)	GCACCTCGGAU <sup>dao</sup> GTCCCCTCT-X X-GAGCCTTA...CAGGGGAGATG	71

не влияет на термическую устойчивость ДНК-дуплексов (табл. 1).

Для выяснения особенностей комплексообразования 2'-диолильных производных ДНК с wybranными белками – субъединицей p50 фактора транскрипции NF-κB [11] и метилтрансферазой SsoII [12], нами были сконструированы олигонуклеотидные дуплексы C, F, I, K и M-O, содержащие единичные остатки 2'-*O*-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина или 2'-*O*-(2,3-дигидроксипропил)уридина в различных положениях олигонуклеотидной цепи (табл. 2). Дуплексы C, F, I, K содержат κB-участок из энхансера генов легких цепей иммуноглобулинов (Ig-κB) [11], дуплексы M и N – короткий фрагмент межгенной области системы рестрикции-модификации с участком связывания C5-цитозиновой метилтрансферазы SsoII (M.SsoII) как транскрипционного фактора (регуляторный участок) [12]. Дуплекс O не содержит участков узнавания данных белков и служит отрицательным контролем.

Способность модифицированных ДНК-дуплексов формировать комплексы с wybranными белками изучали методом “торможения” в геле (табл. 2). Положительными контролями при комплексообразовании служили немодифицированные ДНК-дуплексы J и L, содержащие κB-сайт и регуляторный участок M.SsoII соответственно. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в неденатурирующем 6% ПААГ. Показано, что наличие модифицированных звеньев обоих типов и их положение в κB-участке не влияет на эффективность

**Таблица 2.** Комплексообразование ДНК-дуплексов, содержащих 1,2-диольные группы, с р50-субъединицей фактора транскрипции NF-κB и M.SsoII

Шифр	ДНК-дуплекс (5' → 3'/3' → 5')	Степень связывания*, %	
		M.SsoII	p50
J	GCACCTCGGAAAGTCCCCTCT GAGCCTTTCAGGGGAGATG	—	97
C	(II) GCACCTCGGU <sup>dao</sup> AAGTCCCCTCT-X X-GAGCCT ... TTCAGGGGAGATG	—	95
F	(III) GCACCTCGGAU <sup>dao</sup> AGTCCCCTCT-X X-GAGCCTT ... TCAGGGGAGATG	—	95
I	(IV) GCACCTCGGAAU <sup>dao</sup> GTCCCCTCT-X X-GAGCCTTT ... CAGGGGAGATG	—	97
K	(VI) ACCTCGGAAU <sup>d</sup> GTCCCCTCT GAGCCTTA ·CAGGGGAGA	—	90
L	ATCAAAACAGGACAAATTGTCCTAAAACCAA TAGTTTTGTCCCTGTTTAAACAGGATTTTGTT	70	80
M	(V) ATCAAAACAGGACAAAU <sup>dao</sup> TGTCCTAAAACCAA TAGTTTTGTCCCTGTTTAA ... ACAGGATTTTGTT	38	80
N	(VII) ATCAAAACAGGACAAAU <sup>d</sup> TGTCCTAAAACCAA TAGTTTTGTCCCTGTTTAA ·ACAGGATTTTGTT	40	—
O	(VIII) CTCCAGGCU <sup>d</sup> CAAAT GAGGGTCCGA ·GTTTA	—	50

\* Приведены средние значения, полученные не менее чем в трех независимых экспериментах.

κB-Участок и регуляторный участок метилтрансферазы SsoII подчеркнуты сплошной и пунктирной линиями соответственно. Ошибка измерений не превышала 15%. “—” — не определяли.

связывания с р50. При этом было обнаружено, что связывание с дуплексами L и M, не содержащими κB-сайт, протекает с выходом 80–85%. В этом случае наличие модификации также не влияло на эффективность взаимодействия с белком.

Полученные результаты, свидетельствующие о низкой специфичности узнавания субъединицей р50 NF-κB ДНК-мишени, согласуются с данными Харта и соавт. [13]. Известно, что р50 обладает способностью также узнавать свои полусайты, кроме того, для κB-участков характерно явление полиморфизма [14–17]. Данные по влиянию ионной силы раствора на специфичность связывания р50 NF-κB с ДНК носят противоречивый характер [13, 18, 19]. Нами было показано, что увеличение концентрации соли не приводит к увеличению специфичности связывания р50 с ДНК, что согласуется с данными работ [18, 19]. При изучении ДНК-узнающих белков обычно добавляют poly(dI·dC) — реагент, повышающий специфичность связывания. В случае субъединицы р50 использование poly(dI·dC) не изменило характера связывания. В присутствии этого реагента наблюдалось снижение эффективности образования комплекса в случае как специфических, так и неспецифических лигандов.

По литературным данным более высокая специфичность узнавания κB-участка фактором транскрипции, наблюдаемая *in vivo*, может быть обусловлена взаимодействием субъединицы р50 как с субъединицей р65 [20], так и с другими транскрипционными факторами [19]. В этой связи полагают, что *in vivo* NF-κB первоначально связывается с произвольной последовательностью ДНК, и, “сканируя” ее, находит κB-участок, образуя с ним комплекс за счет формирования специфических ДНК-белковых контактов [13].

В случае M.SsoII комплексообразование с дуплексами L, M, N проводили в присутствии poly(dI·dC). Эффективность связывания немодифицированного ДНК-дуплекса L, содержащего регуляторный участок, составляла 70%. Оказалось, что введение модифицированных звеньев в состав ДНК-дуплексов снижает эффективность образования специфического комплекса с M.SsoII почти в 2 раза (табл. 2). Это может быть связано с тем, что, согласно модели, опубликованной в работе [7], модифицированные нуклеотидные остатки находятся в месте предполагаемых контактов с белком.

Для изучения ковалентного связывания (кросс-линкинга) субъединицы р50 NF-κB и M.SsoII с

2'-альдегидными производными ДНК нами были сконструированы олигонуклеотидные дуплексы Р–V, содержащие единичные остатки 2'-*O*-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридина ( $U^{dap}$ ) или 2'-*O*-(2-оксоэтил)уридина ( $U^o$ ) в различных положениях олигонуклеотидной цепи (табл. 3). Для этого 1,2-диольную группировку в составе олигонуклеотидов окисляли периодатом натрия с последующей гибридизацией с комплементарными матрицами (схема 4 и табл. 3). Дуплексы Р–S содержат кВ-участок, дуплексы Т и U – регуляторный участок M.SsoII. Дуплекс V не содержал участков узнавания и служил отрицательным контролем.

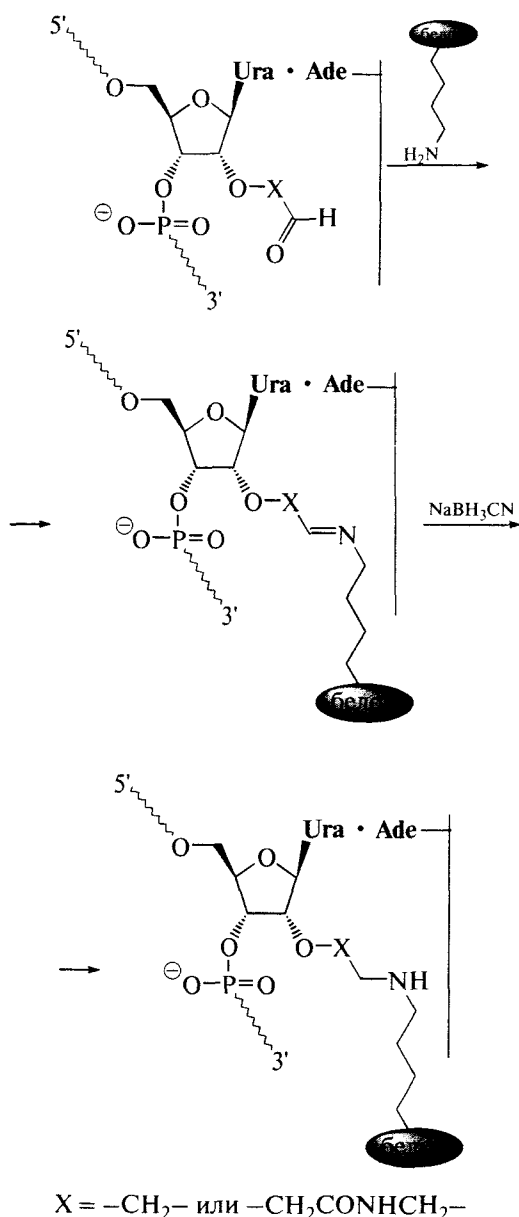


Схема 4.

Отработку оптимальных условий получения ковалентно связанных комплексов р50 и M.SsoII с ДНК проводили с использованием дуплексов R (с

кВ-участком р50) и T (с регуляторным участком M.SsoII) соответственно. Была изучена зависимость эффективности образования конъюгатов от соотношения концентраций ДНК и белка. Наибольшие выходы продуктов ковалентного связывания достигались при соотношении дуплекс–белок 1 : 50 в случае р50 (температура инкубации 20°C) и 1 : 100 в случае M.SsoII (37°C) (рис. 1). Реакцию с M.SsoII проводили в присутствии poly(dI-dC), так как это увеличивало специфичность связывания. В случае р50 добавление poly(dI-dC) сопровождалось, напротив, уменьшением выхода продуктов ковалентного связывания. При отработке условий кросс-линкинга модифицированных олигонуклеотидов с р50 также была исследована возможность проведения реакции в присутствии дитиотреита. Общеизвестно, что дитиотреит стабилизирует третичную структуру белка, что может приводить к увеличению выхода конъюгата. Однако в нашем случае существенного изменения эффективности взаимодействия обнаружено не было.

В табл. 3 приведена эффективность ковалентного связывания различных ДНК-лигандов с субъединицей р50. Было показано, что дуплексы Р–R реагируют с этим белком со сравнимыми выходами 9–12% независимо от положения модифицированного звена в кВ-участке. Отметим, что дуплекс T без кВ-участка и одноцепочечные олигонуклеотиды R1 и S1 (табл. 3) также образовывали конъюгаты с р50 с выходом 7–10% (рис. 2). Очевидно, это связано с тем, что диольные аналоги R1 и S1 – олигонуклеотиды (IV) и (VI), также формировали комплекс с белком. Взаимодействие одноцепочечных фрагментов ДНК с фактором NF-κB описано в работе [17]. Для 2'-оксоэтильных дуплексов выходы продуктов ковалентного связывания с р50 были несколько выше и составляли 15%, однако также наблюдалось образование конъюгата с неспецифическим дуплексом V с выходом 9% (табл. 3). Необходимо отметить, что р50 образует с ДНК, содержащей остатки 2'-*O*-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридина или 2'-*O*-(2-оксоэтил)уридина, два продукта с различной подвижностью в денатурирующем ПААГ (рис. 1).

При взаимодействии M.SsoII с ДНК-дуплексами T и U, содержащими регуляторный участок, выходы ДНК-белковых конъюгатов составляли 27 и 40% соответственно (рис. 3). Неспецифические дуплексы R и V реагировали с более низкой эффективностью (выход продукта 3–4%, табл. 3). Из рис. 3 видно, что M.SsoII образует с ДНК-дуплексами три конъюгата с различной подвижностью в денатурирующем ПААГ. При реакции с одноцепочечными олигонуклеотидами T1 и U1 также наблюдалось образование ДНК-белковых конъюгатов с выходами 8 и 20% (табл. 3). Следует отметить, что в случае 2'-оксоэтильных ДНК ковалентное связывание проходило с большей эффективностью.

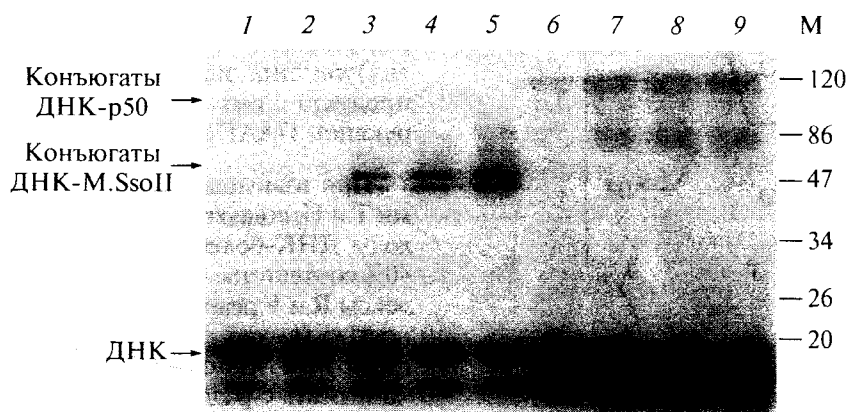
**Таблица 3.** Взаимодействие ДНК-дуплексов, содержащих альдегидные группы, с р50-субъединицей фактора транскрипции NF-κB и ДНК-метилтрансферазой SsoII

Шифр		ДНК (5' → 3'/3' → 5')	Выход ДНК-белкового конъюгата*, %	
			M.SsoII	p50
P	P1	GCACCTCGGU <sup>dap</sup> AAGTCCCCTCT-X	—	9
	P2	X-GAGCCT ... TTCAGGGGAGATG		
Q	Q1	GCACCTCGGAU <sup>dap</sup> AGTCCCCTCT-X	—	10
	Q2	X-GAGCCTT ... TCAGGGGAGATG		
R	R1	GCACCTCGGAAU <sup>dap</sup> GTCCCCTCT-X	3	12
	R2	X-GAGCCTTT ... CAGGGGAGATG	—	10
	R1	GCACCTCGGAAU <sup>dap</sup> GTCCCCTCT-X		
S	S1	ACCTCGGAAU <sup>o</sup> GTCCCCTCT	—	15
	S2	GAGCCTTA · CAGGGGAGA		
	S1	ACCTCGGAAU <sup>o</sup> GTCCCCTCT		
T	T1	ATCAAAACAGGACAAAU <sup>dap</sup> TGTCCTAAAACCAA	27	7
	T2	TAGTTTTGTCCCTGTTTA ... ACAGGATTTTGGTT	8	—
	T1	ATCAAAACAGGACAAAU <sup>dap</sup> TGTCCTAAAACCAA		
U	U1	ATCAAAACAGGACAAAU <sup>o</sup> TGTCCTAAAACCAA	40	—
	U2	TAGTTTTGTCCCTGTTTA · ACAGGATTTTGGTT	20	—
	U1	ATCAAAACAGGACAAAU <sup>o</sup> TGTCCTAAAACCAA		
V	V1	CTCCAGGCU <sup>o</sup> CAAAT	4	9
	V2	GAGGGTCCGA · GTTTA		

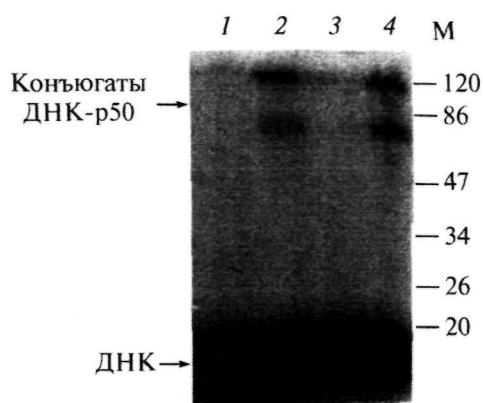
\* См. прим. к табл. 2.

Следующим этапом работы явилось исследование ковалентного связывания <sup>32</sup>P-меченных модифицированных дуплексов R и T с р50 и M.SsoII в присутствии немеченых ДНК-лигандов в возрастающих количествах (рис. 4). В роли последних вы-

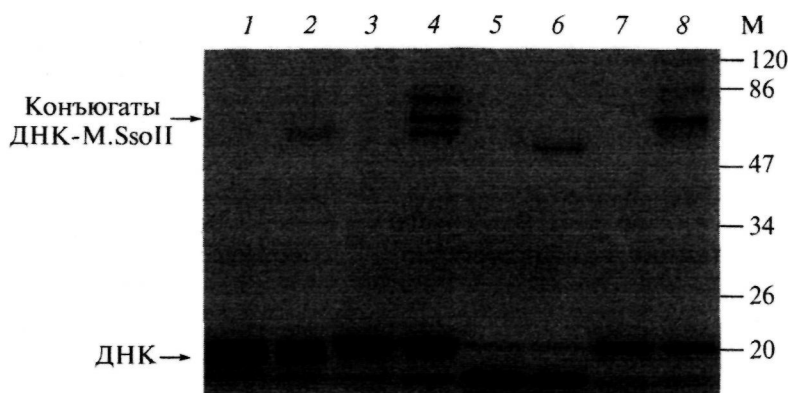
ступали: а) немодифицированные ДНК-дуплексы с участком узнавания; б) немодифицированные ДНК-дуплексы без участка узнавания; в) модифицированный ДНК-дуплекс или олигонуклеотид без участка узнавания. Следует отметить, что такой



**Рис. 1.** Анализ методом электрофореза в 12% ПААГ в присутствии SDS продуктов ковалентного связывания M.SsoII (2–5) и р50-субъединицы NF-κB (7–9) с модифицированными ДНК-дуплексами. Дорожки 1 и 6 – ДНК-дуплексы T и R. В дорожках 2–5 отношения концентрации M.SsoII к концентрации ДНК-дуплекса T – 2 : 1, 20 : 1, 40 : 1, 100 : 1. В дорожках 7–9 отношения концентраций р50 к концентрации ДНК-дуплекса R – 20 : 1, 50 : 1, 100 : 1. M – положения белков-маркеров, молекулярные массы в кДа указаны справа. (Маркеры предварительно прокрашены синим хромом.)



**Рис. 2.** Анализ методом электрофореза в 12% ПААГ в присутствии SDS продуктов ковалентного связывания r50-субъединицы NF-κB с модифицированными олигонуклеотидами R1 (2) и S1 (4). Дорожки 1, 3 – олигонуклеотиды R1 и S1 соответственно. М – положения белков-маркеров, молекулярные массы в кДа указаны справа. (Маркеры предварительно прокрашены синим хромофором.)



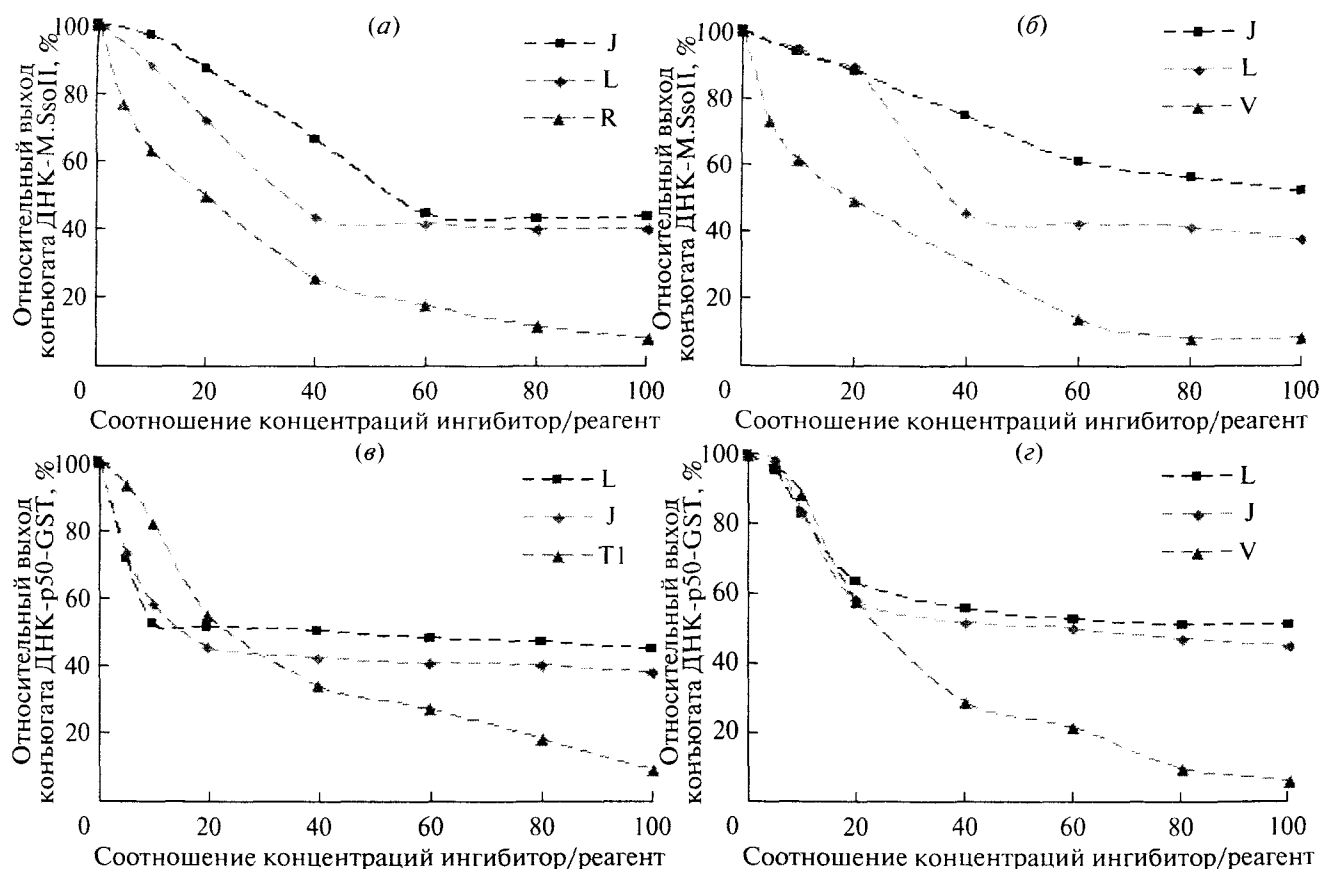
**Рис. 3.** Анализ методом электрофореза в 12% ПААГ в присутствии SDS продуктов ковалентного связывания M.SsoII с модифицированными ДНК-дуплексами R (2), T (4), V (6), U (8). Дорожки 1, 3, 5, 7 – ДНК-дуплексы R, T, V, U. М – положения белков-маркеров, молекулярные массы в кДа указаны справа. (Маркеры предварительно прокрашены синим хромофором.)

подход является стандартным для определения специфичности ковалентного связывания ДНК с белком [21, 22]. В случае r50 в качестве неспецифического модифицированного лиганда выступал одноцепочечный олигонуклеотид T1, поскольку его диольный аналог олигомер (V) обладал наименьшим сродством к белку.

Из рис. 4 видно, что ковалентное присоединение ДНК-дуплексов к белкам ингибируется в случае всех типов конкурирующих молекул ДНК. Добавление в реакционную смесь немодифицированных лигандов снижает выход коньюгата не более чем на 50%. Возможно, изменение характера кривой ингибирования и выход ее на плато при 40–60-кратных избытках лиганда связано с тем, что ковалентное связывание происходит достаточно быстро, и лиганд без модификации не способен эффективно

конкурировать с  $^{32}\text{P}$ -меченным модифицированным фрагментом ДНК.

В случае субъединицы r50 одинаковый характер изменения выхода коньюгата в присутствии ДНК с κB-участком и ДНК произвольной последовательности, не содержащих модифицированных звеньев, возможно, связан с низкой специфичностью взаимодействия r50 с ДНК-мишенью. Во всех случаях наибольший ингибирующий эффект наблюдался при добавлении в инкубационную смесь реакционноспособных лигандов без участка узнавания (рис. 4, кривые V, R – для M.SsoII; кривые T1, V – для r50). Следует отметить, что при использовании конкурентных субстратов, содержащих модификацию, значительное падение относительного выхода продуктов ковалентного связывания происходило даже на начальном этапе,



**Рис. 4.** Зависимость относительного выхода ДНК-белковых конъюгатов от соотношения концентраций ингибитор/реагент. Исследование ковалентного связывания: а) M.SsoII с ДНК-дуплексом, содержащим остаток U<sup>dar</sup>, в присутствии лигандов J, L и R; б) M.SsoII с ДНК-дуплексом, содержащим остаток U<sup>o</sup>, в присутствии лигандов J, L и V; е) p50 с ДНК-дуплексом, содержащим остаток U<sup>dar</sup>, в присутствии лигандов L, J и T1; г) p50 с ДНК-дуплексом, содержащим остаток U<sup>o</sup>, в присутствии лигандов L, J и V.

J – ДНК-дуплекс, содержащий κВ-участок; L – ДНК-дуплекс, содержащий регуляторный участок узнавания M.SsoII; T1, R, V – реакционноспособные одно- и двуцепочечные ДНК-последовательности (табл. 3).

когда избыток реакционноспособного ингибитора не достигал двадцатикратного.

Аналогичные результаты были получены при взаимодействии 2'-оксоэтильных дуплексов S и U с p50 и M.SsoII в условиях конкурентного ингибирования. Неизбирательный характер ковалентного связывания, вероятно, связан с тем, что реакция альдегидных групп олигонуклеотидов с ε-аминогруппами остатков лизина происходит параллельно с формированием специфического комплекса ДНК–белок. Возможно, быстрое протекание химической реакции препятствует специфическому взаимодействию ДНК-связывающего белка с лигандом. Это предположение подтверждается данными аффинной модификации эндонуклеазы рестрикции SsoII [5]. Авторами было обнаружено, что 2'-оксоэтильная группировка в составе модифицированного нуклеотидного остатка, введенного в центральное положение участка узнавания ДНК,

образует ковалентную связь с остатком Lys173 R.SsoII, который удален от ДНК-узнающего центра фермента при образовании специфического ДНК-белкового комплекса.

Таким образом, нами были синтезированы производные ДНК, содержащие в своем составе остатки 2'-O-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридина. Впервые было изучено их взаимодействие с субъединицей p50 фактора транскрипции NF-κB и C5-цитозиновой ДНК-метилтрансферазой SsoII. Проведено сравнительное исследование свойств альдегидных олигонуклеотидов двух типов. Данные, полученные при проведении кросс-линкинга в условиях конкурентного ингибирования, показывают, что реакция 2'-альдегидсодержащих дуплексов с ДНК-узнающими белками носит неспецифический характер.



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Ферменты и белки.** Плазмида pGEX-1, содержащая ген p50 субъединицы фактора транскрипции NF-κB, и плазмида pQMSsoII, содержащая ген M.SsoII, были любезно предоставлены А. Израелем (Институт Пастера, Франция) и А.С. Карягиной (НИИЭиМ РАМН). Эти плазмиды позволяли получать рекомбинантные формы белков p50 и M.SsoII, несущие на N-конце глутатион-S-трансферазу и 6 остатков гистидина соответственно. Плазмидой pGEX-1 трансформировали культуру клеток *E. coli* HB101, плазмидой pQMSsoII – культуру клеток *E. coli* M15 [pREP4]. Экспрессию белков, их выделение и очистку проводили по стандартным методикам. В случае p50 использовали агарозу, содержащую иммобилизованный глутатион [23], а для M.SsoII – двухстадийное выделение с использованием гепарин-сефарозы и Ni-NTA-агарозы [24]. Полинуклеотидкиназа фага T4 – коммерческий препарат производства MBI-Fermentas (Литва).

**Реактивы.** Poly(dI-dC) (Healthcare, США), маркеры молекулярной массы белков 20–120 кДа (MBI-Fermentas, Литва), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (Изотоп, Россия), периодат натрия, цианборгидрид натрия (Fluka, Швейцария), дигидразид янтарной кислоты (Lancaster, Великобритания), предварительно окрашенный маркер молекулярных масс белков SM0441 (MBI-Fermentas, Литва).

**Синтез олигонуклеотидов** осуществляли на автоматическом синтезаторе ABI 394 (Applied Biosystems) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов и растворителей. В качестве полимерного носителя применяли стекло с определенным размером пор (LCAA-CPG-500). Удельная нагрузка полимера первым нуклеозидным звеном составляла 37–60 мкмоль г<sup>-1</sup>. 3'-Амидофосфиты 2'-дезоксинуклеозидов использовали в виде 0.1 М растворов в абсолютном ацетонитриле. Концентрация 3'-амидофосфитов модифицированных нуклеозидов в ацетонитриле составляла 0.2–0.5 М. Время конденсации для модифицированных мономеров увеличивали до 30–60 мин. Степень превращения на этой стадии была несколько ниже, чем для 3'-амидофосфитов 2'-дезоксинуклеозидов, и составила не менее 95–97% [4].

После завершения твердофазного синтеза олигонуклеотиды обрабатывали концентрированным водным раствором аммиака в течение 12–18 ч при 55°C. При этом происходило отщепление олигонуклеотидов от твердофазного носителя и удаление защитных групп. Реакционные смеси анализировали методом ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выделение целевых продуктов проводили методом электрофореза в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины. Контроль чистоты олигонуклеотидов осуществляли методом ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Олигонуклеотиды, содержащие остатки 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридина, синтезированы ранее [6].

**Реакцию с дигидразидом янтарной кислоты** проводили по методике [4].

**Для определения температуры плавления ДНК-дуплексов** изучали зависимость интенсивности флуоресценции комплекса ДНК с красителем SYBR Green I (Sigma-Aldrich, США) от температуры. Изменение флуоресценции регистрировали на приборе для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (Синтол, Россия) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5°C/мин. Исследования проводили в 40 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.05% глицерин, 0.01% Твин-20, 0.01% флуоресцентного красителя SYBR Green. Концентрация ДНК-дуплексов составляла 1.88 мМ.

**Комплексообразование M.SsoII и субъединицы p50 с ДНК-дуплексами, содержащими остатки 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина и 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридина методом “торможения” в геле.**

**Комплексообразование с M.SsoII.** 5'-<sup>32</sup>P-Меченные олигонуклеотидные дуплексы (0.5 пмоль) инкубировали с 50 пмоль M.SsoII в 10 мкл 50 мМ Трис-НCl-буфера (pH 7.5), содержащего 150 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0.25 мкг poly(dI-dC), 10% глицерин, в течение 30 мин при 37°C.

**Комплексообразование с p50.** 5'-<sup>32</sup>P-Меченные олигонуклеотидные дуплексы (1 пмоль) инкубировали с 50 пмоль p50 в 20 мкл 7.5 мМ HEPES-буфера (pH 7.5), содержащего 34 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.05 мМ EDTA, 0.5 мМ дитиотреит, 10% глицерин, в течение 30 мин при 20°C.

Реакционные смеси анализировали в неденатурирующем 7% ПААГ в 50 мМ Трис-боратном буфере (pH 8.3), содержащем 1 мМ EDTA. Визуализацию радиоактивных полос в геле и обсчет данных проводили на приборе Molecular Dynamics PhosphorImager SI (Molecular Dynamics), используя компьютерную программу Image Quantum, версия 5.0. Степень связывания M.SsoII и p50 с ДНК-дуплексами рассчитывали как отношение радиоактивности зоны, соответствующей ДНК-белковому комплексу, к сумме радиоактивности зон, соответствующих ДНК-белковому комплексу и несвязавшейся ДНК.

**Получение ДНК-дуплексов, содержащих остатки 2'-O-(2,5-диоксо-3-азапентилуридина и 2'-O-(2-оксоэтил)уридина.** К осадку 10 пмоль 5'-<sup>32</sup>P-меченного олигонуклеотида, содержащего диольную группу, добавляли 15 мкл 30 мМ ацетата натрия (pH 4–5) и 15 мкл 0.23 М NaIO<sub>4</sub>, реакционную смесь инкубировали 30 мин при 25°C. Затем добавляли 6 мкл 4 М NaOAc, олигонуклеотидный материал высаживали 200-кратным избытком спирта и сушили при 37°C. К модифицированному олигонуклеотиду добавляли

ли комплементарную матрицу (10 пмоль) и проводили «отжиг» в 20 мкл воды, медленно охлаждая раствор от 80°C до комнатной температуры.

**Взаимодействие ДНК-дуплексов, содержащих 2'-альдегидную группировку, с M.SsoII и p50 субъединицей NF-κB.** Образование конъюгата с M.SsoII. 5'-<sup>32</sup>P-Меченные дуплексы (0.5 пмоль) инкубировали с 50 пмоль M.SsoII в 10 мкл 50 mM Трис-НСI-буфера (pH 7.5), содержащего 150 mM NaCl, 5 mM β-меркаптоэтанол и 0.25 мкг poly(dI-dC), в течение 30 мин при 37°C. Затем к реакционной смеси добавляли 275 mM NaBH<sub>3</sub>CN до конечной концентрации 50 mM и выдерживали 1 ч при 37°C.

**Образование конъюгата с p50.** 5'-<sup>32</sup>P-Меченные олигонуклеотидные дуплексы (1 пмоль) инкубировали с 50 пмоль p50 в 20 мкл 7.5 mM HEPES-буфера (pH 7.5), содержащего 34 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mM EDTA, 0.5 mM дитиотреит, 10% глицерин, в течение 30 мин при 20°C. Затем к реакционной смеси добавляли 275 mM NaBH<sub>3</sub>CN до конечной концентрации 50 mM и выдерживали 1 ч при 37°C.

Продукты обеих реакций разделяли электрофорезом в 12% SDS-ПААГ с 4% концентрирующей полосой. Перед нанесением на гель реакционные смеси выдерживали 5 мин при 95°C в денатурирующем буфере (50 mM Трис-НСI (pH 6.8), 2% глицерин, 1% SDS, 0.05% β-меркаптоэтанол, 0.1% бром-феноловый синий) для разрушения нековалентных комплексов ДНК-белок.

Положение 5'-<sup>32</sup>P-меченных соединений определяли радиоавтографически.

**Изучение специфичности аффинной модификации M.SsoII и p50 NF-κB.**

К 50 пмоль белка (M.SsoII или p50) и 5'-<sup>32</sup>P-меченному дуплексу, содержащему участок узнавания M.SsoII или p50 (0.5 пмоль или 1 пмоль соответственно), добавляли конкурирующий ДНК-лиганд в 5-, 10-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100-кратном избытке по отношению к меченому дуплексу. Эксперименты проводили в 10 мкл буфера для M.SsoII или 20 мкл для p50. Продукты реакции анализировали как описано выше.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке программы РФФИ-ННИО «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых» (гранты № 08-04-91973 ННИОМ<sub>а</sub> и IRTG GRK 1384) и грантов РФФИ № 07-04-00545<sub>а</sub> и 09-04-0315<sub>а</sub>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зацепин Т.С., Долинная Н.Г., Кубарева Е.А., Ивановская М.Г., Метелев В.Г., Орецкая Т.С. // *Успехи химии*. 2005. Т. 74. С. 84–103.
2. Dolinnaya N.G., Zubin E.M., Kubareva E.A., Zatsepin T.S., Oretskaya T.S. // *Curr. Org. Chem.* 2009. V. 13. P. 1029–1049.
3. Kachalova A.V., Zatsepin T.S., Romanova E.A., Stetsenko D.A., Gait M.J., Oretskaya T.S. // *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*. 2000. V. 19. P. 1693–1707.
4. Zubin E.M., Stetsenko D.A., Zatsepin T.S., Gait M.J., Oretskaya T.S. // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. V. 13. P. 4912–4920.
5. Судьбина А.Е., Зацепин Т.С., Пингоуд В., Пингоуд А., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия*. 2005. Т. 70. С. 1137–1144.
6. Романенков А.С., Устюгов А.А., Зацепин Т.С., Никулова А.А., Колесников И.В., Метелев В.Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия*. 2005. Т. 70. С. 1474–1487.
7. Романенков А.С., Кусиль О.В., Зацепин Т.С., Ямскава О.В., Карягина А.С., Метелев В.Г., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. С. 1341–1349.
8. Michel F., Crucifix C., Granger F., Eiler S., Mouscadet J.F., Korolev S., Agapkina J., Ziganshin R., Gottikh M., Nazabal A., Emiliani S., Benarous R., Moras D., Schultz P., Ruff M. // *EMBO J.* 2009. V. 28. P. 980–991.
9. Freier S.M., Altmann K.H. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4429–4443.
10. Zatsepin T.S., Stetsenko D.A., Arzumanov A.A., Romanova E.A., Gait M.J., Oretskaya T.S. // *Bioconjugate Chem.* 2002. V. 13. P. 822–830.
11. Sen R., Baltimore D. // *Cell*. 1986. V. 46. P. 705–716.
12. Karyagina A.S., Lunin V.G., Degtyarenko K.N., Uvarov V.Y., Nikolskaya I.I. // *Gene*. 1993. V. 124. P. 13–19.
13. Hart D.J., Speight R.E., Cooper M.A., Sutherland J.D., Blackburn J.M. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 1063–1069.
14. Lumley M., Hart D.J., Cooper M.A., Symeonides S., Blackburn J.M. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 339. P. 1059–1075.
15. Nijnik A., Mott R., Kwiatkowski D.P., Udalova I.A. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 1497–1501.
16. Kunsch C., Ruben S.M., Rosen C.A. // *Mol. Cell Biol.* 1992. V. 12. P. 4412–4421.
17. Zabel U., Schreck R., Baeuerle P.A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 252–260.
18. Menetski J.P. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 7619–7625.
19. Phelps C.B., Sengchanthalangsy L.L., Malek S., Ghosh G. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 24392–24399.
20. Urban M.B., Schreck R., Baeuerle P.A. // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 1817–1825.
21. Haynes S.R. *RNA-Protein Interaction Protocols*. Totowa: Humana Press, 1999.
22. Wang Z., Wang X., Rana T.M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 16995–16998.
23. Smith D.B., Johnson K.S. // *Gene*. 1988. V. 67. P. 31–40.
24. Карягина А.С. Дис. ... докт. биол. наук. М.: ВНИИ РАСХН, 1997. С. 331.

## 2'-Aldehyde Oligonucleotides: Synthesis and Use for Affinity Modification of DNA-Recognizing Proteins

E. A. Khomyakova<sup>a</sup>, E. V. Kazanova<sup>a,\*</sup>, E. M. Zubin<sup>a</sup>, E. A. Kubareva<sup>b</sup>, N. V. Molochkov<sup>c</sup>,  
E. M. Ryazanova<sup>d</sup>, and T. S. Oretskaya<sup>a</sup>

\* Phone: +7 (495) 939-3148; fax: +7 (495) 939-3181; e-mail: evkazanova@mail.ru

<sup>a</sup> Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, Russia

<sup>d</sup> All-Russia Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, Russia

Oligonucleotides with 1,2-diol grouping were prepared from 2'-O-[2-(2,3-dihydroxypropyl)amino-2-oxoethyl]uridine 3'-phosphoramidite. The thermal stability of modified DNA duplexes and their ability to form complexes with the p50 subunit of the NF- $\kappa$ B transcription factor and (cytosine-5)-DNA methyltransferase SsoII were studied. The periodate oxidation of the 1,2-diol grouping of the oligonucleotides resulted in reactive 2'-aldehyde derivatives. The opportunity of their use for the affinity modification of DNA-recognizing proteins was studied.

*Key words:* DNA–affinity modification, DNA–protein interactions, modified oligonucleotides