

Д. С. Новопашина¹, С. А. Холодарь¹, Е. К. Апарцин², М. И. Мещанинова¹,
Е. Н. Воронина¹, М. Л. Филипенко^{1,2}, А. Г. Веньямина^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: danov@niboch.nsc.ru

НОВЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ДНК*

Впервые созданы флуоресцентные зонды на основе 5'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), а также тандемов 5'- и 3'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) к участку гена метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНФР), содержащему полиморфизм С677Т. Проведено сравнительное исследование флуоресцентных свойств зондов и их дуплексов с ДНК-мишенями в зависимости от длины олигонуклеотидной части, структуры линкеров, соединяющих остаток пирена и олигонуклеотид, а также наличия 3'-концевой модификации, а именно 3' – «инвертированного» тимидина. Методом термической денатурации с детекцией по изменению флуоресценции продемонстрирована перспективность использования предложенных зондов для определения полиморфизма С677Т в гене МТНФР.

Ключевые слова: олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), флуоресцентные зонды, пирен, точечные мутации, метилентетрагидрофолатредуктаза.

В настоящее время задачей многих научных исследований является разработка методов диагностики генетических полиморфизмов. Ген метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНФР) человека кодирует FAD-зависимый фермент 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазу. Мутационная замена С → Т в положении 677 гена МТНФР приводит к нарушению работы фермента, что вызывает нарушение фолатного цикла. Это в свою очередь повышает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [1], врожденных дефектов развития нервной системы, осложнений беременности, а также онкологических заболеваний [2].

Перспективным подходом к детекции точечных мутаций ДНК является использование флуоресцентных зондов на основе олигонуклеотидов. Пиренильные производные

олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) являются привлекательными инструментами для детекции точечных мутаций ДНК благодаря уникальным свойствам как олигонуклеотидной части, так и флуорофора. Введение 3'-модификации в олигонуклеотидные зонды предотвращает их элонгацию ДНК-полимеразой в амплификационной смеси [3].

Нами предлагается использовать 5'- и 3'-монопиренильные конъюгаты олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) для создания систем флуоресцентной детекции точечных мутаций ДНК на примере полиморфизма С677Т в гене МТНФР. Для повышения нуклеолитической стабильности и предотвращения элонгации 5'-монопиренильные конъюгаты олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) будут дополнительно модифицированы путем введения на 3'-конец так называемого

* Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-01634-а, ГК ФАНИ № 02.522.12.2005 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № П1334).

«инвертированного» тимидина – тимидина, присоединенного 3'-3'-межнуклеотидной связью [4].

Цель исследования – создать и исследовать свойства новых флуоресцентных зондов для детекции точечных мутаций, представляющих собой 5'-монопиренильные конъюгаты олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), содержащие «инвертированный» тимидин, а также их тандемы с 3'-монопиренильными конъюгатами олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов).

Материал и методы

Олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) и их 3'-«инвертированные» аналоги, содержащие 3'- или 5'-фосфат, а также олигодезоксирибонуклеотиды-мишени были получены на синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Россия) с использованием протоколов твердофазного фосфитамидного синтеза, оптимизированных для данного прибора. Нуклеозидный состав олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и олигодезоксирибонуклеотидов подтверждали методом исчерпывающего ферментативного гидролиза с последующим анализом гидролизатов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе «Милихром А-02» («ЭкоНова», Россия). В работе использованы реактивы и растворители фирм Serva (США), Glen Research (США), Fluka (Швейцария), Merck (Германия), Sigma (США), ICN (США).

Синтез 5'- и 3'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) (Ia-IIIa) проводили по аналогии с методом, описанным Д. С. Новопашиной и соавт. [5]. К 2–3 ОЕ260 (примерно 0,03 мкмоль) 5'- или 3'- фосфатсодержащего олигонуклеотида в виде цетилтриметиламмониевой соли прибавляли 5 мг (41 мкмоль) 4-N,N-диметиламинопиридина в 50 мкл абс. DMSO, 6,8 мг (25 мкмоль) трифенилфосфина в 25 мкл абс. DMSO, 5,3 мг (25 мкмоль) 2,2'-дипиридилдисульфида в 25 мкл абс. DMSO и перемешивали 15 мин при 37 °С. Олигонуклеотид с активированным фосфатом осаждали 2 %-ным LiClO₄ в ацетоне, быстро промывали осадок ацетоном, растворяли в 5 мкл H₂O, прибавляли 2 мг (7,5 мкмоль) гидрохлорида 1-пиренилметиламина в смеси 25 мкл абс. DMSO и 5 мкл абс. ТЕА и перемешивали реакционную смесь 2 ч при 37 °С. Нуклеотидный материал осаждали эфиром.

Полученные производные выделяли методом препаративного гель-электрофореза, обессоливали и осаждали в виде литиевых солей. Выходы синтезированных конъюгатов составили 40–60 %.

Синтез 5'- и 3'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) (Ib-IIIb) проводили по аналогии с методом, описанным Д. С. Новопашиной и соавт. [6]. К 2–3 ОЕ260 (примерно 0,03 мкмоль) 5'-или 3'-фосфатсодержащего олигонуклеотида в виде цетилтриметиламмониевой соли прибавляли 5 мг (41 мкмоль) 4-N,N-диметиламинопиридина в 50 мкл абс. DMSO, 6,8 мг (25 мкмоль) трифенилфосфина в 25 мкл абс. DMSO, 5,3 мг (25 мкмоль) 2,2'-дипиридилдисульфида в 25 мкл абс. DMSO, перемешивали 15 мин при 37 °С и добавляли к реакционной смеси 2 мкл этилендиамина. После перемешивания в течение 1 ч при 37 °С нуклеотидный материал осаждали эфиром. Сухой осадок растворяли в смеси 5 мкл 0,05 М NaHCO₃ (pH 8,3) и 10 мкл DMF. Добавляли раствор 2 мг (5,2 мкмоль) N-оксисукцинимидного эфира 1-пиренбутановой кислоты в 20 мкл DMF порциями по 10, 5 и 5 мкл каждые 30 минут при перемешивании при 37 °С. Полученные производные выделяли методом препаративного гель-электрофореза с последующим обессоливанием и осаднением в виде литиевых солей. Выходы синтезированных конъюгатов составили 30–50 %.

Масс-спектры пиренильных конъюгатов записаны с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра (REFLEX III, Bruker Daltonics, Германия) и ESI масс-спектрометра (Agilent Technologies, США) сотрудником ИХБФМ СО РАН Ю. В. Герасимовой. УФ-спектры записаны с использованием УФ-спектрометра «Shimadzu UV-2100» (Япония) в воде при концентрации олигонуклеотидов $5 \cdot 10^{-7}$ М в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Спектры флуоресценции конъюгатов олигонуклеотидов с пиреном и их дуплексов с ДНК-мишенями, а также кривые плавления этих дуплексов записывали на спектрофлуориметре Kontron Instrument SFM 25 (Kontron, Италия), используя $2 \cdot 10^{-7}$ М растворы в 200 мкл буфера, содержащего 6,7 мМ трис-НСl, 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 3,6 мМ MgCl₂, 0,05 % Tween 20, при длине волны возбуждения 345 нм и температуре 25 °С. При записи кривых плавления регистрировали интенсивность

флуоресценции на длинах волн 392 и 480 нм. Кривые плавления дуплексов обрабатывали, используя программное обеспечение OriginPro7.5.

Результаты исследования и обсуждение

Синтезированы 3'- и 5'-монопиренильные производные окта- и пентадека(2'-О-метилрибонуклеотидов) и их аналогов с 3'-концевым «инвертированным» тимидином (Ia,б-IIIa,б) по аналогии с работами [5; 6] (рис. 1, а). Для последующего сравнительного изучения физико-химических свойств 5'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) проведен синтез их дезоксирибоаналогов. Полученные производные олигонуклеотидов охарактеризованы с помощью MALDI TOF и ESI масс-спектрометрии (данные не представлены), а также методами УФ- и флуоресцентной спектроскопии. В УФ-спектрах поглощения монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) наблюдали пик, соответствующий олигонуклеотидной части, на длине волны 260 нм и два пика при 330 и 345 нм, соответствующие поглощению пиренильной группы. Монопиренильные производные олигонуклеотидов имели характерные флуоресцентные спектры с максимумами испускания мономерной флуоресценции на длинах волн 381 и 392 нм.

Интенсивность мономерной флуоресценции 8-звенных конъюгатов была значительно выше их 15-звенных аналогов. Увеличение длины линкера приводило к увеличению флуоресценции, тогда как наличие 3'-«инвертированного» тимидина не оказывало заметного влияния на спектры. Важно отметить, что интенсивность испускания флуоресценции производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) превышала интенсивность испускания флуоресценции их дезоксирибоаналогов.

Пирен является флуорофором, чувствительным к взаимодействиям как с соседними основаниями той же цепи, так и с основаниями комплементарной цепи. Как правило, при таких взаимодействиях происходит тушение флуоресценции пирена за счет фотоиндуцированного переноса электрона [7]. Для исследования изменения флуоресценции зондов при гибридизации с ДНК в качестве мишеней использовали олигодезоксирибонуклеотиды (IVa,б и Va,б), последовательности которых соответствовали участку гена MTHFR, содержащему полиморфизм C677T (рис. 1, б).

При гибридизации 5'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) как с полностью комплементарными мишенями (IVa и Va), так и с мишенями (IVб и Vб), содержащими однонуклеотидную замену, наблюдали тушение флуоресценции (рис. 2, а). Интенсивность флуо-

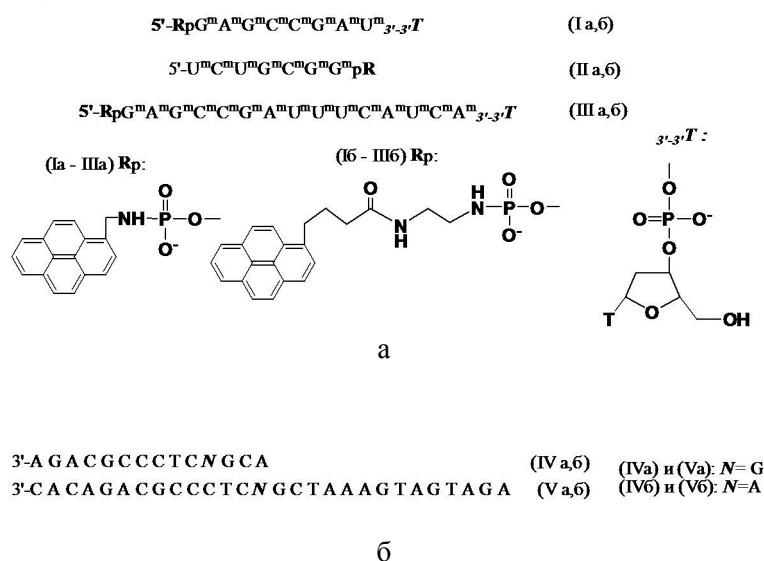


Рис. 1. Пиренильные конъюгаты и модельные ДНК-мишени:
 а – структура синтезированных 5'- и 3'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов); б – последовательности ДНК-мишеней

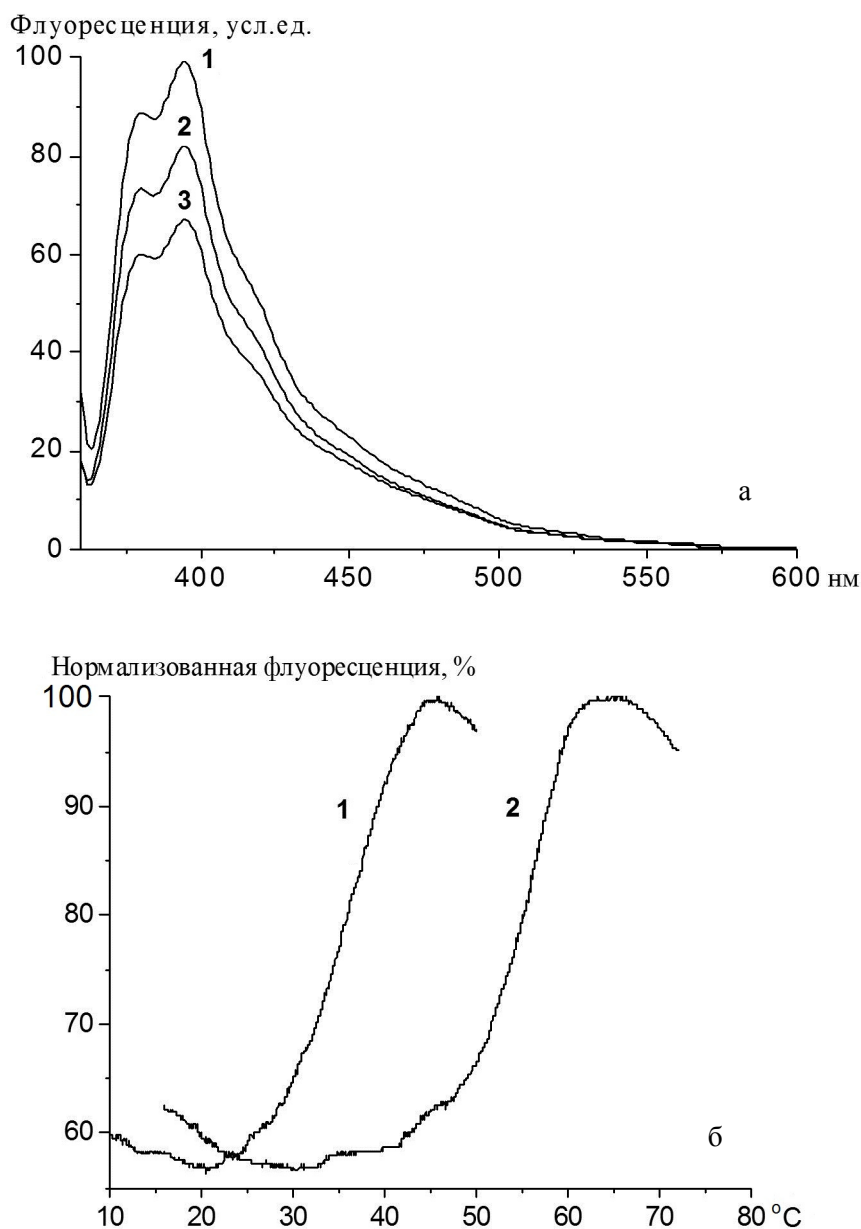


Рис 2. Флуоресцентные свойства дуплексов 5'-монопиренильного производного (Ia) с ДНК-фрагментами:

a – спектры испускания флуоресценции: (спектр 1) 5'-монопиренильное производное (Ia); (спектр 2) его полностью комплементарный дуплекс с ДНК-фрагментом (IVa); (спектр 3) дуплекс с ДНК-фрагментом (IVб), содержащий мисматч;

б – нормализованные кривые плавления: (кривая 1) дуплекс 5'-монопиренильного производного (Ia) с ДНК-фрагментом (IVб), содержащий мисматч; (кривая 2) дуплекс 5'-монопиренильного производного (Ia) с ДНК-фрагментом (IVa)

ресценции дуплексов с мисматчем в каждом случае была значительно меньше интенсивности флуоресценции соответствующих правильных дуплексов.

При нагревании дуплексов 5'-монопиренильных производных пентадека- и окта(2'-

О-метилрибонуклеотидов) происходит плавление дуплексов, сопровождающееся увеличением мономерной флуоресценции. Для этих зондов регистрировали двукратное увеличение флуоресценции в процессе денатурации дуплексов. Наличие однонуклео-

тидного несоответствия (мисматча) в дуплексе вызывает уменьшение температуры плавления таких дуплексов, что можно детектировать методом термической денатурации дуплексов с регистрацией по изменению мономерной или эксимерной флуоресценции пирена. При исследовании стабильности дуплексов этим методом было показано, что температура плавления дуплексов, содержащих мисматч, на 14–20 °С ниже температуры плавления полностью комплементарных дуплексов (рис. 2, б). Изменение интенсивности флуоресценции при плавлении дуплексов ДНК фрагментов с зондами на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) было значительно сильнее, чем в случае зондов на основе олигодезоксирибонуклеотидов, что подтверждает преимущество зондов, предложенных в данной работе. Полученные сведения говорят о возможности использования 5'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) для детекции мисматчей в ДНК методом термической денатурации с детекцией по изменению флуоресценции.

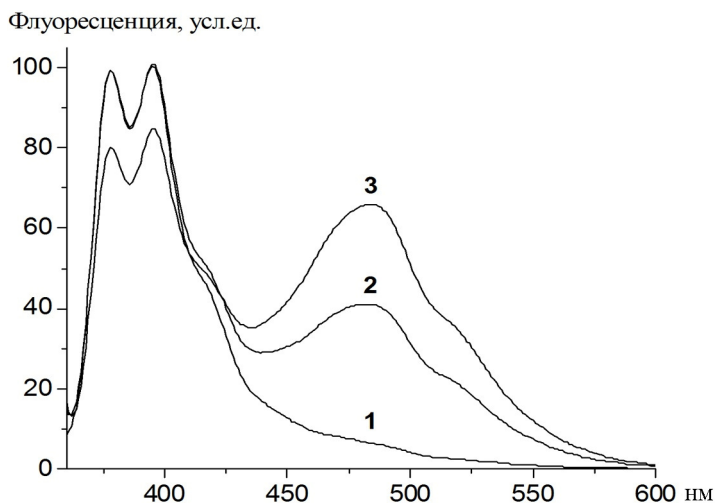
Другим подходом к детекции нуклеиновых кислот и определению в них мутаций является использование тандемных флуоресцентных зондов. Создание и применение пиренильных тандемных зондов на основе олигодезоксирибонуклеотидов описано в литературе [8; 9]. В процессе гибридизации такого зонда два остатка пирена сближаются, что приводит к образованию эксимера и, следовательно, к разгоранию эксимерной

флуоресценции. Нами впервые предложены пиренильные тандемные зонды на основе 5'- и 3'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов).

При связывании зондов (I + II) с ДНК-мишенью наблюдали увеличение интенсивности эксимерной флуоресценции на длине волны 480 нм и тушение мономерной флуоресценции на длине волны 392 нм. Самую высокую интенсивность эксимерной флуоресценции наблюдали в дуплексах тандемного зонда (Iб + IIа), содержащего линкер минимальной длины ($-\text{CH}_2\text{NH}-$) между олигонуклеотидной частью конъюгата и остатком пирена в 5'-компоненте (IIа) и более длинный линкер ($-(\text{CH}_2)_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$) в 3'-компоненте (Iб) (рис. 3). Чувствительность эксимерной флуоресценции в дуплексах тандемных зондов к мисматчу оказалась выше, чем чувствительность мономерной флуоресценции в случае 5'-монопиренильных зондов.

При нагревании дуплекса тандемного зонда с ДНК-мишенью происходит расхождение комплементарных цепей и, как следствие, разгорание мономерной флуоресценции и тушение эксимерной. Наибольшую разницу между температурами плавления правильных и содержащих мисматч дуплексов наблюдали в случае тандемного зонда (Iб+IIа). Полученные результаты демонстрируют возможность использования предложенных тандемных зондов для детекции мисматчей в ДНК методом термической денатурации, регистрируемой по изменению флуоресценции.

Рис. 3. Флуоресцентные свойства тандемных флуоресцентных зондов и их дуплексов с ДНК-фрагментами. Спектры испускания флуоресценции тандемного зонда (Iб) + (IIа) (спектр 1) и его дуплексов с ДНК-фрагментом (IVа) (кривая 2) и с ДНК-фрагментом (IVб) (кривая 3)



Заключение

На основании проведенных исследований впервые предложены флуоресцентные зонды на основе 5'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), а также тандемов 5'- и 3'-монопиренильных производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) для разработки системы диагностики нарушений фолатного цикла. Методом термической денатурации с детекцией по изменению флуоресценции на модельной системе показана перспективность использования обоих типов зондов для определения мутационной замены С677Т в гене МТНFR. Полученные данные указывают на перспективность применения созданных зондов как новых инструментов для детекции точечных мутаций ДНК.

Список литературы

1. Gemmati D., Serino M. L., Trivellato C., Fiorini S., Scapoli G. L. C677T Substitution in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene as a Risk Factor for Venous Thrombosis and Arterial Disease in Selected Patients // *Haematologica*. 1999. Vol. 84, № 9. P. 824–828.
2. Коваленко Т. Ф., Ванюшева О. В., Шолов И. А., Сосин Д. В., Суховерхова А. С., Козлова Т. В., Бокарев И. Н., Сорокина А. В., Озолина Л. А., Патрушев Л. И. Промоторы генов МТНFR при гипергомоцистеинемии и РТЕН при злокачественных и доброкачественных опухолях эндометрия и яичников // *Биоорган. химия*. 2006. Т. 32, № 4. С. 414–423.
3. Turcatti G., Romieu A., Fedurco M., Tairi A. P. A New Class of Cleavable Fluorescent Nucleotides: Synthesis and Optimization as Reversible Terminators for DNA Sequencing by Synthesis // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 4. P. e25.
4. Novopashina D. S., Totskaya O. S., Lomzov A. A., Venyaminova A. G. 3'-Modified oligo(2'-O-methylribonucleotides) as Improved Probes for Hybridization with RNA // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005. Vol. 24, № 5–7. P. 527–531.
5. Новопашина Д. С., Тоцкая О. С., Холодарь С. А., Мещанинова М. И., Веняминова А. Г. Олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) и их производные. III. 5'-Моно и 5'-биспиренильные производные олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и их 3'-модифицированных аналогов. Синтез и свойства // *Биоорган. химия*. 2008. Т. 34, № 5. С. 671–682.
6. Novopashina D., Kuznetsova M., Venyaminova A. 2'-O-Modified Oligoribonucleotides with Terminal 3'-3'-Internucleotide Linkage and Their Derivatives // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001. Vol. 20, № 4–7. P. 903–907.
7. Manoharan M., Tivel K. L., Zhao M. Base-Sequence Dependence of Emission Lifetimes for DNA Oligomers and Duplexes Covalently Labeled with Pyrene: Relative Electron-Transfer Quenching Efficiencies of A, G, C and T Nucleosides toward Pyrene // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 99, № 48. P. 17461–17472.
8. Masuko M. Optimization of Excimer-Forming Two-Probe Nucleic Acid Hybridization Method with Pyrene as a Fluorophore // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26, № 23. P. 5409–5416.
9. Bichenkova E. V., Sardarian A., Savage H. E., Rogert C., Douglas K. T. An Exciplex-Based, Target Assembled Fluorescence System with Inherently Low Background to Probe for Specific Nucleic Acid Sequences // *ASSAY Drug Dev. Technol.* 2005. Vol. 3, № 1. P. 39–46.

Материал поступил в редколлегию 28.09.2010

D. S. Novopashina, S. A. Kholodar, E. K. Apartsin, M. I. Meshchaninova,
E. N. Voronina, M. L. Filipenko, A. G. Venyaminova

NEW TOOLS FOR POINT MUTATIONS DETECTION

In the present research we designed novel fluorescent probes based on 5'-monopyrene derivatives of oligo(2'-O-methylribonucleotides) and tandems of 5'- and 3'-monopyrene derivatives of oligo(2'-O-methylribonucleotides) targeting to the fragment of methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) gene containing C677T polymorphism. The effect of probes length, structure of linkers connecting pyrene residue with oligonucleotide part and the presence of thymidine attached at the 3'-termini by a 3'-3'-phosphodiester internucleotide bond on fluorescent properties of probes and their duplexes with DNA targets was studied. The fluorescent properties of proposed probes were shown to be sensitive to the mononucleotide substitution in DNA target. The developed probes were demonstrated to be utilized for the detection of polymorphism C677T in MTHFR gene by the method of thermal duplex denaturation with fluorescence change registration.

Keywords: oligo(2'-O-methylribonucleotides), fluorescent probes, pyrene, point mutations, methylenetetrahydrofolate-reductase.