

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Апарин Илья Олегович

**Азидопроизводные красителей и ненуклеозидные реагенты на основе
хиральных 1,3-диолов для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов**

Специальность: 02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2017

Работа выполнена в Лаборатории органического синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный руководитель: **Формановский Андрей Альфредович**, доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Готтих Марина Борисовна**, доктор химических наук, профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, отдел химии нуклеиновых кислот, главный научный сотрудник

Тимофеев Эдуард Николаевич, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория дизайна и синтеза биологически активных соединений, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Защита состоится «14» марта 2018 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Гибридизационные зонды нуклеиновых кислот (НК) имеют огромное значение в современных методах анализа генетического материала в областях медицинской диагностики, геномике, агрохимии, вирусологии, молекулярной и клеточной биологии. Современными технологиями с применением флуоресцентных ДНК-зондов, главным образом, являются: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (qPCR, кПЦР), флуоресцентный вариант Саузерн-блоттинга для ДНК и нозерн-блоттинга для мРНК, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), ДНК-микрочиповые технологии и визуализация РНК в живой клетке. Самым распространенным способом детекции НК-мишеней является регистрация сигнала флуоресценции при гибридизации ДНК-зонда с комплементарной ему последовательностью. Это обусловлено чувствительностью и универсальностью метода. За последние два десятилетия было предложено множество архитектур синтетических олигонуклеотидных зондов: молекулярные маяки, смежные зонды, Инь-Янь зонды, TaqMan и прочие зонды для кПЦР и т.д.

Колоссальный рост методов в химии синтетических олигонуклеотидов, их доступность и новые принципы дизайна флуоресцентных ДНК-зондов значительно расширили спектр применений конъюгатов олигонуклеотидов. Развитие твердофазного синтеза олигонуклеотидов и методов их эффективной и мягкой конъюгации открыли возможности синтеза модифицированных ДНК-зондов. Химический синтез и модификация нуклеиновых кислот позволили упростить и удешевить процедуру получения зондов в сравнении с ферментативным синтезом полинуклеотидных зондов. Отработка надежных методов введения флуоресцентных маркеров, как в самом твердофазном синтезе, так и пост-синтетически, позволила расширить возможности гибридизационных анализов и в основном заменить ферментативные, радиоизотопные и прочие метки для большинства приложений.

Для корректной работы флуоресцентного зонда, повышения его избирательности и аффинности чрезвычайно важен дизайн структуры такого зонда, включающий подбор последовательности нуклеотидов и его длины, выбор флуоресцентного маркера и, при необходимости, гасителя флуоресценции, структуры линкеров для введения меток, а также применение в некоторых случаях неприродных модификаций олигонуклеотидной цепи. Основные требования к работе зонда – его высокая чувствительность по отношению к заданной мишени, а также яркость флуоресцентного сигнала. Несмотря на то, что синтез и применение ДНК-зондов давно стал рутинной в лабораторной и клинической практике, до сих пор существуют задачи, требующие новых инструментов и оптимальных подходов к дизайну структуры флуоресцентных зондов. Диапазон модифицированных мономеров и флуоресцентных маркеров непрерывно пополняется новыми соединениями для отдельных задач. Кроме того, разрабатываются новые способы усиления флуоресцентного сигнала для регистрации низкокопийных и пространственно-затрудненных НК-мишеней, наряду с новыми подходами для увеличения отношения полезный/фоновый флуоресцентный сигнал зонда. Актуальной задачей является также синтез флуорофоров с заданными спектральными характеристиками, высокой яркостью, фотостабильностью и инертностью для инструментальных методов гибридизационных анализов: флуоресцентной микроскопии, ПЦР в реальном времени. Однако получение флуоресцирующего красителя с желаемыми параметрами совершенно не гарантирует успех в случае применения его в качестве маркера

в составе олигонуклеотидной последовательности. После синтеза функционального производного флуорофора требуется оценить эффективность его введения в ДНК-зонд, влияние олигонуклеотидной последовательности на фотофизические параметры маркера и, наконец, работу самого зонда в конкретном методе. Таким образом, флуорофор проходит длинный путь с момента его синтеза до применения в качестве метки зондов.

Методы «мягкой» модификации биомолекул – «клик»- и биоортогональные реакции – вскоре после формулирования их принципов в начале 2000-х гг были апробированы для конъюгации синтетических олигонуклеотидов. Медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение (Cu(I)AAC) прочно внедрилось в инструментарий методов синтетических олигонуклеотидов. Его не катализируемый комплексами меди вариант (SPAAC) с участием реакционноспособных производных циклических ацетиленов также последнее время применяется для модификации синтетических ДНК. Использование последнего особенно актуально для целей конъюгации, когда употребление медных катализаторов невозможно или нежелательно. Эти реакции находят все новые применения для модификации олигонуклеотидов, но оптимизация условий их протекания зачастую оказывается нетривиальной задачей и требует значительных усилий.

Цель работы: улучшить фотофизические параметры ДНК-зондов за счет использования новых флуоресцентных меток и оптимизации структуры самих олигонуклеотидных зондов, а также развить методологию конъюгации олигонуклеотидов с помощью «клик»-реакций.

В ходе работы были решены следующие задачи:

- 1) Предложены новые коротковолновые флуорофоры для мечения олигонуклеотидов с улучшенными флуоресцентными характеристиками. Подробно изучено их поведение в модельных экспериментах и на реальных объектах.
- 2) Предложена нестандартная комбинация пиреновый эксимер/ Cu_3 в качестве высокоэффективной донорно-акцепторной пары флуорохромов для олигонуклеотидных зондов. Подробно изучено их взаимодействие и перенос энергии в составе зондов.
- 3) Улучшены способы конъюгации олигонуклеотидов с функциональными производными меток, а также иммуноглобулинами с применением методов «клик»-реакций.

Научная новизна и практическая значимость

Предложен новый хиральный ненуклеозидный каркас мономеров для синтеза олигонуклеотидов на основе коммерчески доступного D-пантолактона; полученные на его основе пиреновые и азобензольные хромофоры встроены в состав ДНК-зондов. Изучено влияние мономерного состава пиреновой метки на свойства эксимерной флуоресценции. С использованием синтезированных зондов проведены эксперименты по совместной гибридизации с зондом, меченным Cu_3 , на комплементарной матрице. Подробно изучен перенос энергии от пиреновой пары на Cu_3 , оптимизирована структура и конфигурация системы смежных зондов на основе пиреновой пары и Cu_3 .

В качестве новой метки с высокой яркостью флуоресценции для «голубого» канала детекции кПЦР-амплификаторов предложен 1-фенилэтинилпирен (PEPy). Оценено поведение нового маркера в составе олигонуклеотидных последовательностей и зондов в сравнении с 7-аминокумарином (AMCA). PEPy как маркер зондов для кПЦР оказался

предпочтительнее в сравнении с АМСА и его сульфированным аналогом Alexa Fluor 350 по яркости флуоресценции и снижению значения порогового цикла (Ct) относительно зондов с обоими кумаринами.

Приведен синтез ряда азидопроизводных флуоресцентных красителей, биотина и холестерина. С их участием отработаны условия твердофазной модификации 5'-алкиновых олигонуклеотидов Cu(I)AAC на модельных олигонуклеотидах.

Разработана система для конъюгации олигонуклеотидов с иммуноглобулинами из двух кросс-линкеров на основе реакционноспособного азидабензоциклооктина (ADIBO NHS) **15** и цианинового красителя Cy5 с азидогруппой и NHS эфиром **16**. Отработаны условия контролируемого введения азидогрупп в составе реагента **16** к иммуноглобулинам и последующая конъюгация с олигонуклеотидами. Разработанный подход также с легкостью может быть использован для модификации других белковых глобул и биомолекул, а также, например, иммобилизации их на твердой поверхности и наночастицах.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: 7th Cambridge symposium on nucleic acids chemistry and biology (2017, Кембридж, Великобритания); XXVIII Зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (2016, Москва, Россия); международная конференция "Химическая биология", посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре (2016, Новосибирск, Россия); VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2015, Новосибирск, Россия); XVIth Symposium «Chemistry of Nucleic Acid Components» (2014, Чески-Крумлов, Чехия).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 187 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 346 ссылок. Диссертация содержит 63 рисунка и 18 таблиц.

Публикации

По материалам работы опубликовано 5 статей в международных рецензируемых журналах.

Основное содержание работы

I. «Молекулярные маяки» с пиреновыми метками

Пирен и его производные способны образовывать эксимер (возбужденный димер), что приводит к появлению дополнительной широкой длинноволновой полосы в спектре испускания пирена. Пиреновый эксимер неоднократно применялся в ДНК-зондах и прочих сенсорах. По появлению эксимерной полосы в спектре флуоресценции можно судить, например, о сближении двух пиреновых хромофоров в составе НК-зондов на комплементарной им матрице. Некоторые полезные свойства пиренового эксимера выделяют его среди прочих органических флуорофоров: значение Стоксова сдвига более 100 нм, время жизни возбужденного состояния составляет 0,1 мкс и более, высокая инертность в отношении биомолекул и биологических сред. С другой стороны, на яркость флуоресценции

пиренового эксимера оказывает влияние не только квантовый выход флуоресценции и коэффициент молярного поглощения, но и соотношением эксимерной и мономерной (Е/М) полос флуоресценции. Кроме того, пирен и его эксимер в значительной мере склонны к диполь-дипольным взаимодействиям со своим окружением, что может приводить к тушению эксимерной флуоресценции. Таким образом, использование пиренового эксимера в качестве маркера для олигонуклеотидных зондов требует детальной оптимизации структуры самой пиреновой метки и рационального дизайна зонда для улучшения флуоресцентных характеристик.

Мы постарались оптимизировать эксимер-образующий пиреновый маркер в составе зондов, последовательно вводя пиреновые остатки в олигонуклеотидный зонд при твердофазном синтезе. Для этого был разработан двухстадийный синтез аминокдиола **2** в качестве ненуклеозидного каркаса на основе коммерчески доступного D-(-)-пантолактона (рис. 1). Приведенная методика позволяет быстро нарабатывать соединение **2** в две стадии в мультиграммовых количествах без хроматографической очистки. Очевидно, что метод может быть использован и для восстановления прочих водорастворимых амидов – как первичных, так и вторичных и третичных. На основе синтона **2** нами был получен ряд фосфамидитных реагентов **5а,б,в**, содержащих остатки пиренкарбоновой, пиренуксусной кислот, азобензольного тушителя Dabcyl, а также модифицированного носителя с тем же тушителем **7а**.

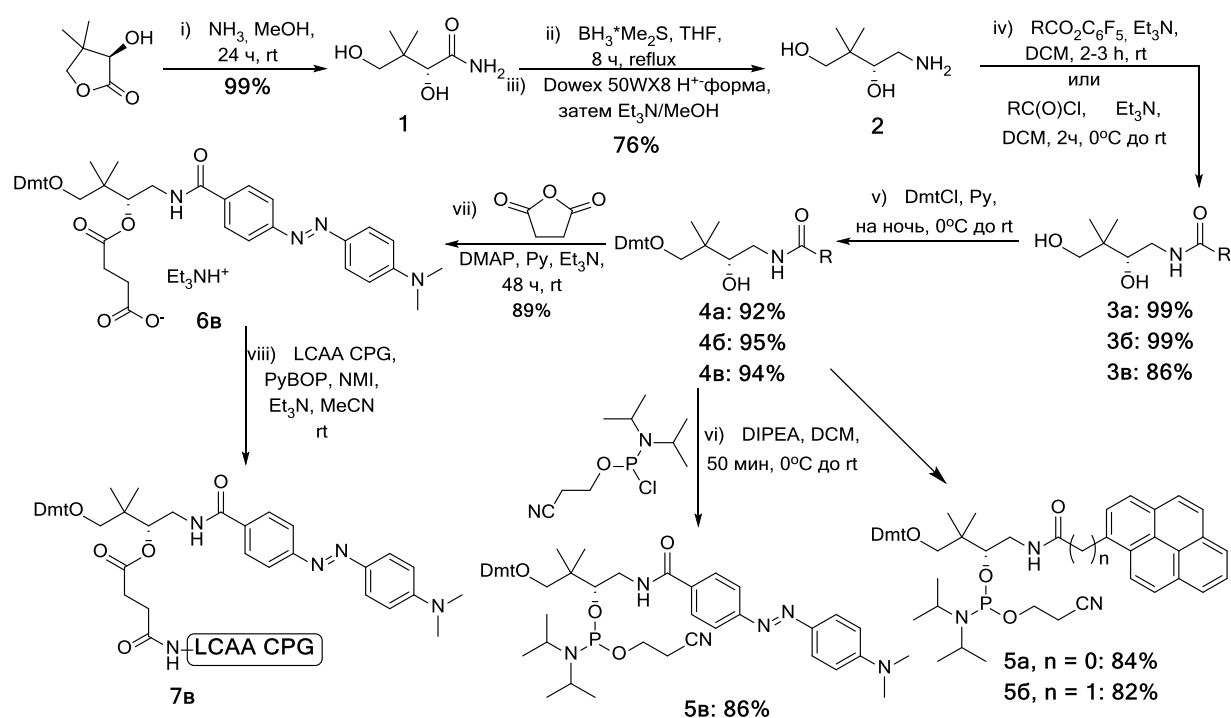


Рис. 1 Схема синтеза фосфорамидитов и модифицированного пористого стекла для твердофазного синтеза эксимеробразующих «молекулярных маяков».

Далее полученные амидофосфиты и модифицированный носитель были использованы в твердофазном синтезе шпильчатых зондов – так называемых молекулярных маяков на основе двух последовательностей (табл. 1). Поскольку имелись сведения, что дополнительный тушитель флуоресценции в ДНК-зондах способствует значительному снижению фоновой флуоресценции, синтезировали также зонды с двойным тушителем 3'-Dabcyl. В 5'-положение зонда вводили одиночные и конденсированные пиреновые

модификации. Последовательной конденсацией амидофосфитов **5a** и **5b** были получены зонды с четырьмя эксимерными комбинациями: P1P1, P1P2, P2P1 и P2P2, а также одиночными пиренами: P1 и P2 (рис. 2).

Таблица 1. Последовательности эксимерных молекулярных маяков (**Seq1** и **Seq2**) и комплементарной ДНК матрицы (**Seq3**). Тушителем и флуорофором обозначены 5'-F и 3'-Q, соответственно. Жирным шрифтом обозначен самокомплементарный (образующий стебель) участок, комплементарная матрица последовательность подчеркнута.

Seq1:		5'-F- GCGGGGTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGC -Q-3'											
Probe	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	MB6	MB7	MB8	MB9	MB10	MB11	MB12	
5'-F	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2	
3'-Q	Dabcyl						2×Dabcyl						

Seq2:		5'-F- CCGGGGCTCATTCGAAACGCATTCATTACCCCGG -Q-3'											
Probe	MB13	MB14	MB15	MB16	MB17	MB18	MB19	MB20	MB21	MB22	MB23	MB24	
5'-F	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2	P1	P1P1	P2P1	P2	P1P2	P2P2	
3'-Q	Dabcyl						2×Dabcyl						

Seq3: 5'-TTGAGCGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGGGAG-3'

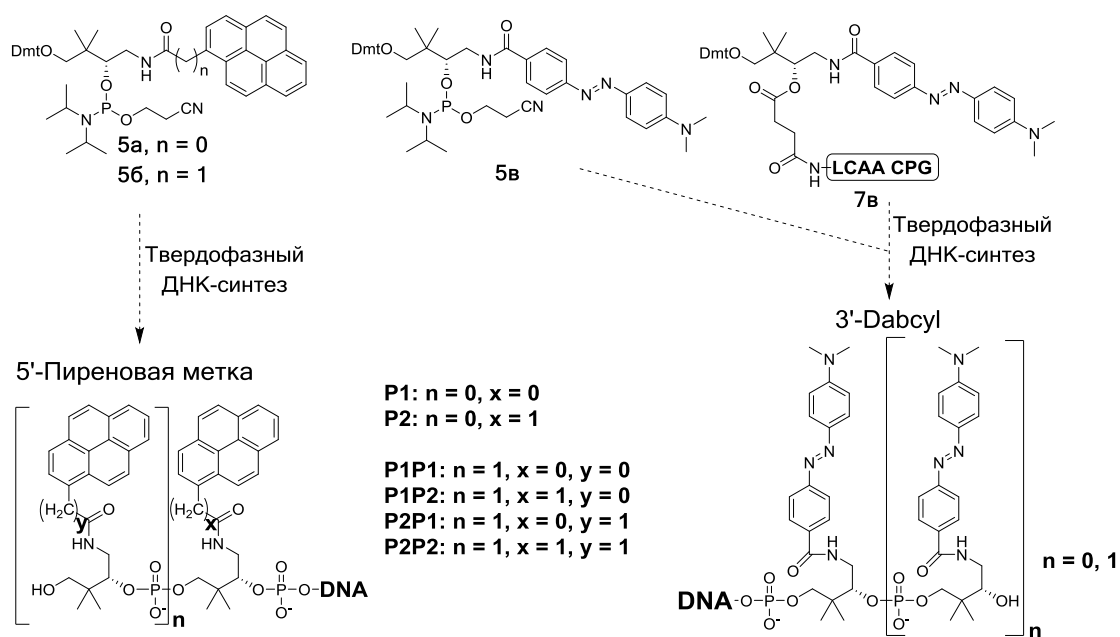


Рис. 2 Использование модифицирующих реагентов в синтезе олигонуклеотидных зондов.

После гибридизации молекулярных маяков MB1–24 с комплементарной матрицей **Seq3** определяли их фотофизические характеристики. Были оценены относительное увеличение интенсивности флуоресценции при гибридизации с комплементарной матрицей и соотношение интенсивности флуоресценции на эксимерном и мономерном максимуме испускания пиренов. Спектр поглощения и флуоресценции для пирена с сопряженной амидной группой оказался сглаженным, в то время как для пиренацетамида наблюдается колебательно-вращательная структура электронных спектров (рис. 3). Различные комбинации мономеров P1 и P2 в составе пиреновых пар обладали значительной разницей в

амплитуде и положении эксимерной полосы испускания. По смещению эксимерной флуоресценции в длинноволновую область можно расположить комбинации пиреновых пар следующим образом: P2P2 – 475 нм, P1P1 – 505 нм, P1P2 и P2P1 – 510 нм. Мономерный состав эксимера, очевидно, сильно влияет и на его стабильность, так, Е/М соотношение в спектрах испускания варьируется в диапазоне от 0,5 до 8,6. (табл. 2). Эксимер, образованный остатками мономеров P1P1, оказался самым стабильным и ярким исходя из спектров флуоресценции (рис. 3).

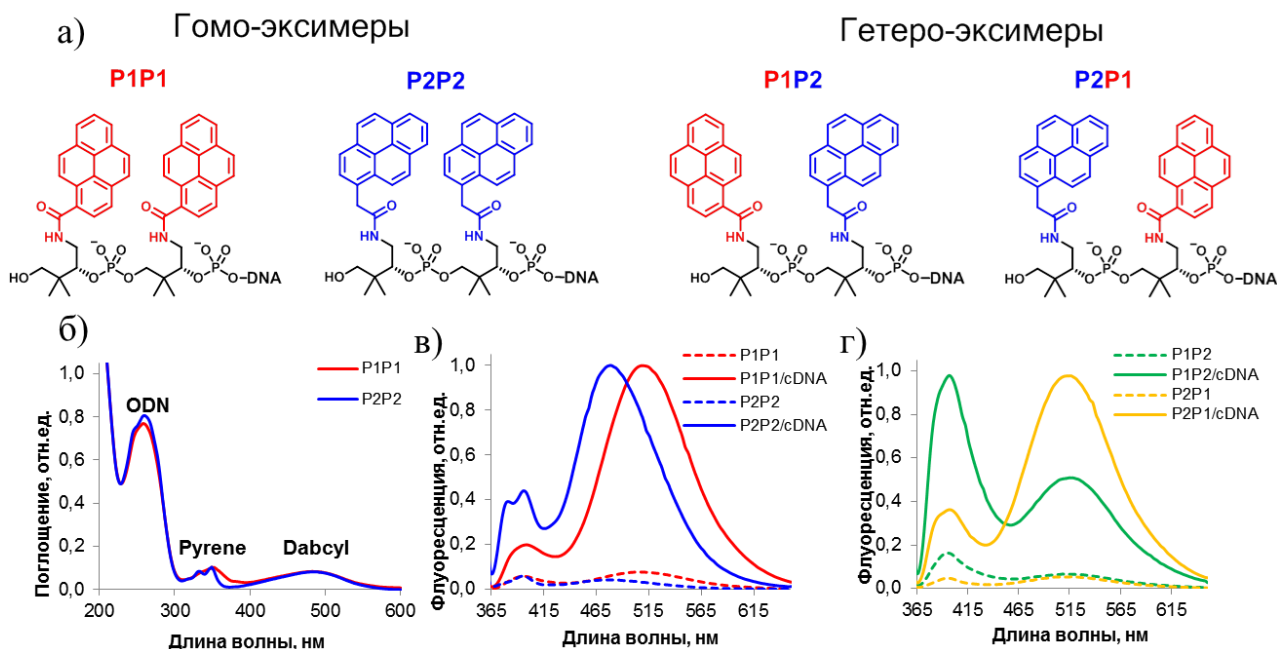


Рис. 3 а) Структура четырех пиреновых флуорофоров с эксимерной флуоресценцией; б) типичные спектры поглощения двух зондов MB20 и MB24, меченные 5'-P1P1 и 5'-P2P2 пиреновыми парами и 3'-Dabcyl; в) нормированные спектры испускания шпильчатых зондов (пунктирные линии) и их дуплексов с матрицей Seq3 (сплошная линия): MB20 (P1P1) – красная линия, MB24 (P2P2) – голубая линия; г) MB21 (P2P1) – желтая линия, MB23 (P1P2) – зеленая линия.

Таблица 2 Флуоресцентные параметры эксимерной метки в составе молекулярных маяков и данные молекулярного моделирования.

Зонд	5'- Пиреновая пара	Эксимер λ_{\max} , нм	SBR ^a		E/M ^a	Среднее расстояние, Å ^б	Среднее перекрывание ^б	
			Моно	Exc				
Seq1	MB2	P1P1	505	3,2	4,6	5,9	7,1±2,3	9,6
	MB3	P2P1	510	3,1	2,1	3,5	9,5±3,6	5,7
	MB5	P1P2	510	5,6	4,6	1,0	10,9±2,7	5,7
	MB6	P2P2	475	19,5	4,4	1,5	10,9±2,9	5,0
Seq2	MB14	P1P1	505	2,2	23,1	5,4	6,2±2,2	10,9
	MB15	P2P1	510	5,3	16,1	2,6	9,3±3,1	9,2
	MB17	P1P2	510	3,8	3,4	0,5	9,1±3,1	7,7
	MB18	P2P2	475	2,8	22,1	2,5	10,2±3,6	3,1

а) Отношение сигнал фон рассчитывали как отношение $I_{\text{ПМВ}_i}/I_{\text{ОМВ}_i}$, где $I_{\text{ОМВ}_i}$ – фоновая флуоресценция самокомплементарного шпильчатого зонда MB_i, $I_{\text{ПМВ}_i}$ – флуоресценция дуплекса зонда с матрицей Seq3; б) отношение $I_{\text{ПМВ(Exc)}}/I_{\text{ПМВ(Py)}}/I_{\text{ПМВ(Py)}}$ гибридов зондов с матрицей Seq3; в) рассчитанные из молекулярной динамики.

Различную интенсивность эксимерной флуоресценции и соотношение максимумов эксимерной и мономерной флуоресценции в ряду гомологичных пиреновых хромофоров мы решили объяснить за счет моделирования молекулярной динамики. Очевидно, при прочих равных условиях увеличение амплитуды полосы длинноволнового максимума говорит о большей стабильности пиренового эксимера. То есть, с повышенной вероятностью два пиреновых фрагмента находятся в стэкинге, а также с большей контактной площадью взаимодействия. Для оценки этих параметров совместно с Головиным Андреем Викторовичем (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова) были смоделированы 5'-концевые фрагменты зондов **Seq1** и **Seq2**: 6 нуклеотидных остатков с двумя терминальными пиренами.

Мы получили средние расстояния между центрами пиреновых остатков для каждой динамической траектории (табл. 2). Из **рис. 4** видно, что два фрагмента с эксимером P1P1 обладают бóльшим числом контактов пиренов, чем остальные шесть (розовая и голубая линии), кроме того среднее расстояние в динамических траекториях между пиренами у P1P1 оказалось наименьшим (табл. 2). Эти данные удачно коррелируют с анализом спектров флуоресценции: соотношение Е/М максимально для зондов MB2 и MB14, меченных P1P1.

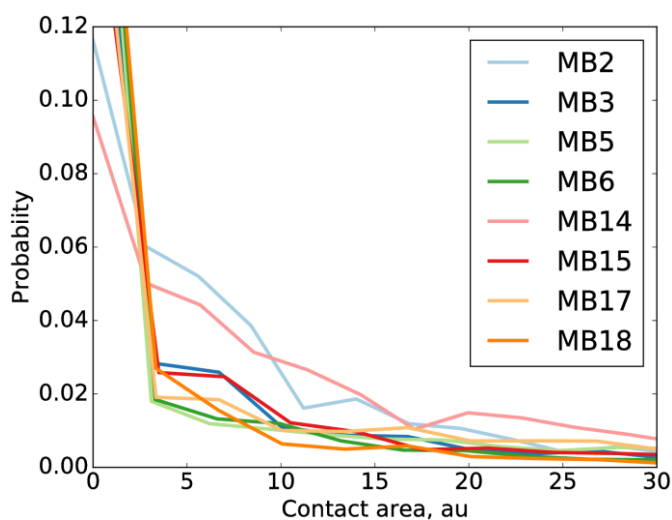


Рис. 4 Вероятностное распределение площади перекрытия пиреновых остатков в составе зондов. Площадь взаимодействия рассчитана в количестве контактных атомов в противостоящих пиреновых остатках. Перекрытие пиренов учитывалось, только если расстояние между центрами соседних пиренов меньше или равно 4.0 Å.

II. Пиреновый эксимер в качестве FRET-донора в олигонуклеотидных зондах

Пиреновый эксимер является потенциально удачным донором флуоресценции из-за высокого времени жизни возбужденного состояния. Широкая полоса эксимера перекрывается с поглощением множества красителей в зелено-оранжевой области видимого спектра (450-650 нм). В качестве нетривиальной донорно-акцепторной пары флуорофоров нами были подобраны пиреновый эксимер и цианиновый краситель Су3. Помимо времени жизни флуоресценции эксимера на эффективности FRET положительно отражается отличное перекрытие спектра испускания эксимера и поглощения Су3 и высокий коэффициент молярного поглощения Су3 ($\sim 150000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$). Кроме того, флуоресценция Су3 практически не возбуждается при облучении мягким ультрафиолетом на максимуме поглощения пирена. Применение молекулярного маяка, меченного пиреновой парой, в тандеме с бинарным зондом, меченным Су3 на 3'-конце, приведет к увеличению Стоксова сдвига флуоресценции до 220 нм, возбуждая флуоресценцию Су3 на 350 нм. Таким образом, энергия испускания пирена и его эксимера в широком сине-зеленом диапазоне при резонансном переносе будет сконцентрирована в узкой полосе испускания Су3 с максимумом флуоресценции на 570 нм (**рис. 5**).

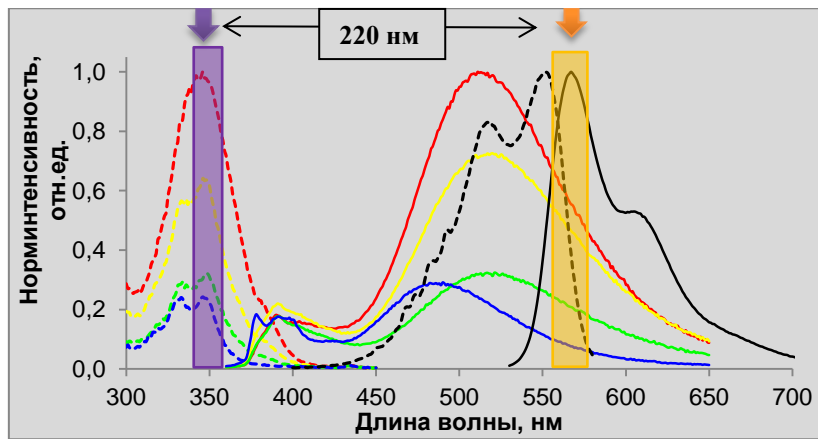


Рис. 5 Спектры возбуждения пиреновых пар при регистрации флуоресценции на максимуме эксимерной флуоресценции (пунктирные линии) и спектры флуоресценции (сплошные линии): MB14 (P1P1) – красные, MB15 (P2P1) – желтые, MB17 (P1P2) – зеленые, MB18 (P2P2) – синие. Спектры возбуждения (пунктирная черная линия) и флуоресценции (сплошная черная линия) сульфо-Cy3. Фиолетовым и оранжевым цветами условно обозначены каналы возбуждения и регистрации флуоресценции на 350 и 570 нм, соответственно.

На **рис. 5** представлены спектры возбуждения и испускания четырех молекулярных маяков MB14,15,17,18, гибридованных на комплементарной матрице, наложенные на спектры зонда с сульфо-Cy3. Мы изучили поведение каждой из четырех эксимерных меток с различной интенсивностью как Фёрстеровского донора, поскольку FRET-пара пиреновый эксимер/Cy3 требовала детального анализа и оптимизации в составе ДНК зондов. Молекулярный маяк с эксимерной меткой и зонд с 3'-сульфо-Cy3 гибридовали с комплементарными им матрицами ODN1-7 таким образом, чтобы эксимер и сульфо-Cy3 располагались на разном расстоянии (**рис. 6**).

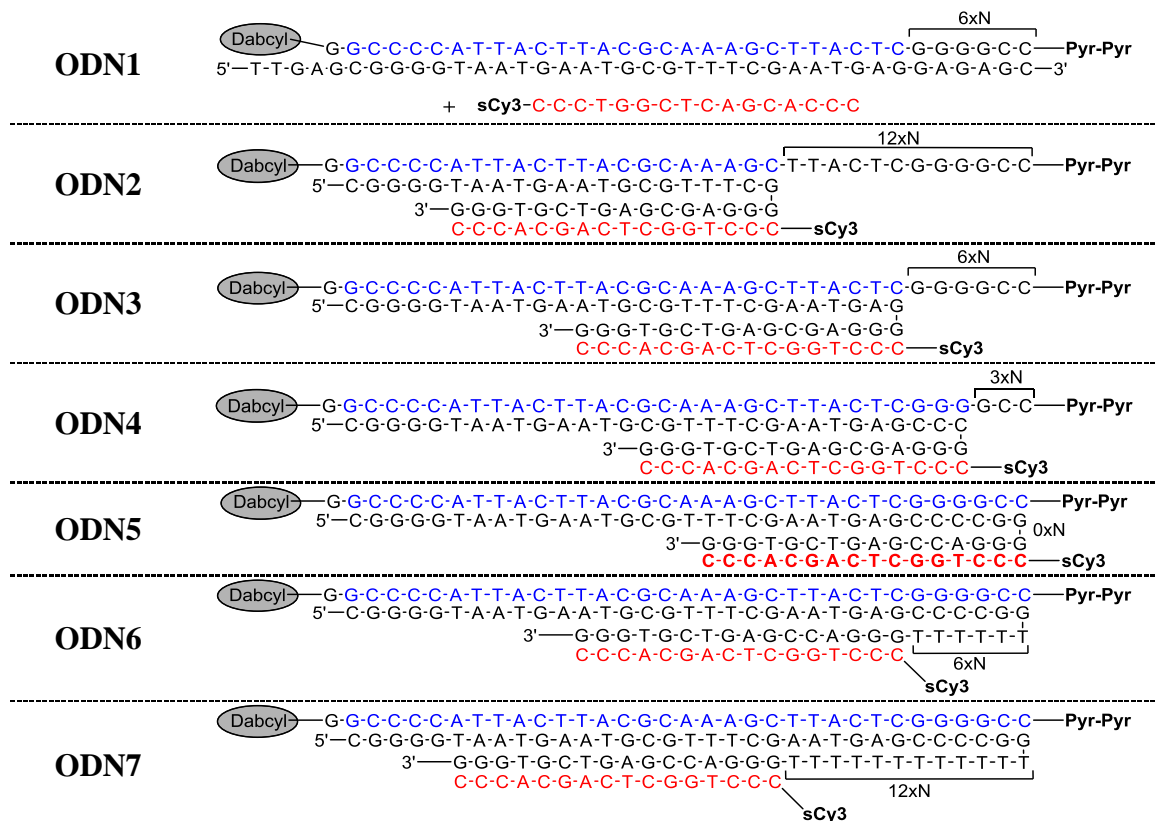


Рис. 6 Последовательности зондов и матриц, взаимное расположение пиренового эксимера и Cy3 при гибридизации двух зондов на матрице.

Учитывая, что флуоресценция пирена и его эксимера может сильно тушиться нуклеотидами самого зонда и НК-мишени, несколько матриц было подобрано таким образом, чтобы пиреновый эксимер на 5'-конце зонда отстоял от дуплекса на 12, 6 и 3 нуклеотида. В свою очередь ранее было показано, что квантовый выход флуоресценции Су3 увеличивается при связывании с биополимерами, и особенно за счет фиксации в двухцепочечной ДНК. Учитывая этот факт, последовательность зонда с цианиновым красителем была выбрана полностью комплементарной матрице, чтобы Су3 был максимально сближен с дуплексом при гибридизации.

Оптимизируя относительную конфигурацию эксимера и цианинового красителя, мы гибридизовали эксимерный зонд MB14,15,16,17 и линейный зонд BP-1 с различными матрицами в молярном соотношении 1:1:1 в концентрации 1 нМ. Отношение полезный сигнал/фон мы оценивали по увеличению флуоресценции на 570 нм при гибридизации обоих зондов на комплементарной матрице. Относительное увеличение флуоресценции на длине волны 570 нм при гибридизации на матрице слабо зависело от состава эксимерной метки, в отличие от последовательности матрицы. Оптимальным расположением эксимера и цианинового красителя Су3 оказалась конфигурация зондов на матрице, когда Су3 соседствует с дуплексом, а пиреновая пара отстоит от него на 6 нуклеотидов.

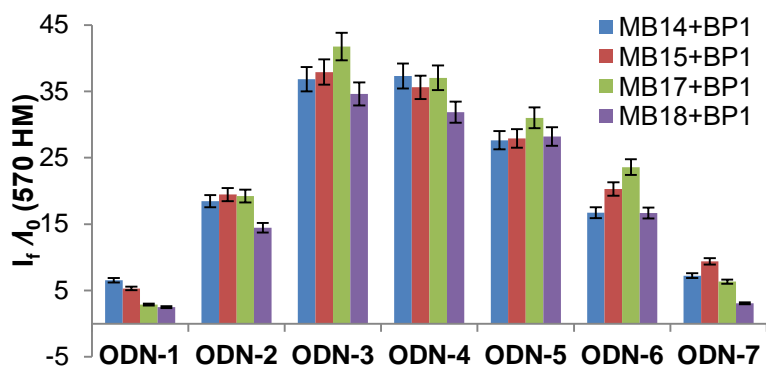


Рис. 7 Увеличение интенсивности флуоресценции на масимуме испускания сульфю-Су3 (570 нм) при совместной гибридизации эксимерных молекулярных маяков и зонда BP-1 на матрицах ODN1-7.

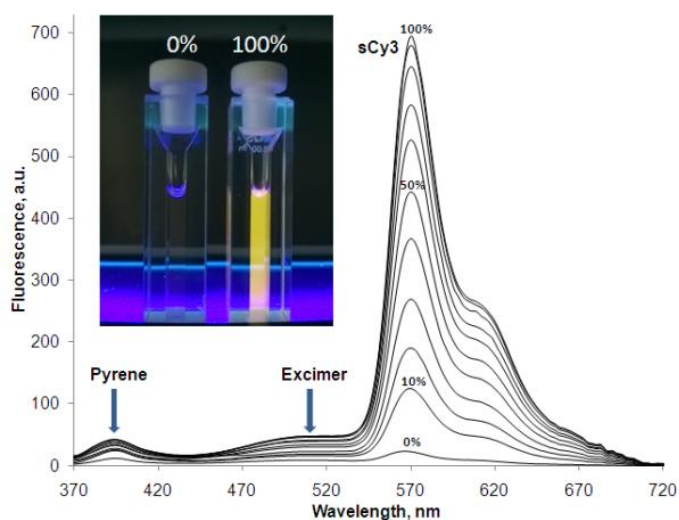


Рис. 8. Профили флуоресценции эксимерного флуорофора P1P1 и Су3 в составе смежных зондов MB14 и BP-1 при титровании комплементарной матрицей. Концентрации зондов – 1 нМ, концентрация матрицы с шагом в 0,1 нм. Наложено изображение кювет с обоими зондами в отсутствии и присутствии 1 нм комплементарной матрицы ODN-3.

Также система двух зондов на основе эксимерного молекулярного маяка и смежного зонда с СуЗ имеет количественный отклик полосы флуоресценции акцептора СуЗ при титровании обоих зондов комплементарной матрицей (**рис. 8**).

Мы рассчитали эффективность тушения донорных эксимерных флуорофоров в присутствии акцептора – СуЗ. С этой целью мы использовали систему из трех олигонуклеотидов тех же последовательностей как показано на **рис. 6** с отсутствующим сульфо-СуЗ. Из разницы амплитуды эксимерной полосы в присутствии и отсутствии СуЗ были вычислены значения E_{quench} , которые достигали в некоторых случаях 70% и выше. Однако увеличение амплитуды СуЗ не было пропорционально тушению полосы эксимерной флуоресценции. Так, несмотря на разную природу пиренового эксимера и на различия в спектрах флуоресценции, эффективность тушения в первую очередь зависит от взаимного расположения красителей, а не от природы эксимерного донора.

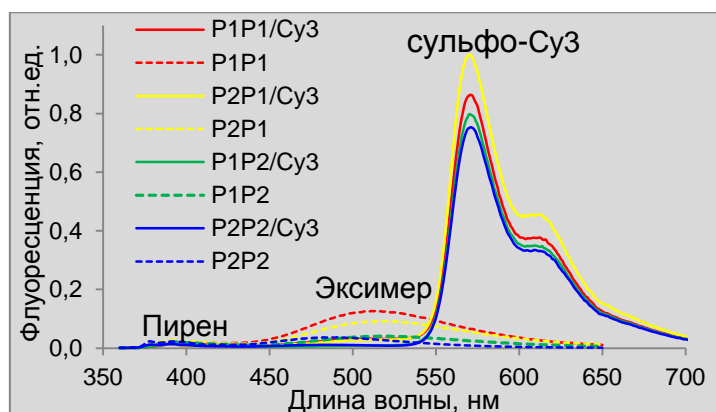


Рис. 9 Спектры флуоресценции зондов МВ-14,15,17,18 и ВР-1 или ВР-2, гибридованные на матрице ODN-3. Зонд ВР гибридовали меченный акцепторным сульфо-СуЗ – ВР-1 (сплошные линии) или без флуоресцентного красителя – ВР-2 (пунктирные линии).

Эффективность FRET может быть корректно оценена из разницы времен жизни флуоресценции эксимера в отсутствии и присутствии акцептора. Для четырех гомологичных пиреновых пар были измерены времена жизни флуоресценции на максимуме испускания эксимера в отсутствие СуЗ и вместе с ним (**рис. 9**). В каждом случае амплитуды кривых снижались при переносе энергии на СуЗ. Было обнаружено, что графики затухания флуоресценции имеют двухэкспоненциальную природу, то есть в длинноволновом максимуме испускания пирена присутствует два излучающих состояния хромофора. Эти данные согласуются с литературными. В нескольких работах, изучающих природу эксимерной флуоресценции пирена, четко отмечается существование двух возможных механизмов образования пиренового эксимера: динамический и статистический. Появление длинноволновой полосы в спектре флуоресценции пирена и его производных характеризуется различным механизмом образования: возбуждением при сближении в пространстве пиреновых остатков с полным или частичным их перекрыванием и образованием двух разных возбужденных комплексов.

Для расчетов эффективности FRET через два изменения времени жизни статистического и динамического эксимеров пользовались формулой:

$$\eta = 1 - \frac{\langle \tau_{1/2DA} \rangle}{\langle \tau_{1/2D} \rangle} = 1 - \frac{\sum \tau_{iDA} \alpha_{iDA}}{\sum \alpha_{iDA}} / \frac{\sum \tau_{iD} \alpha_{iD}}{\sum \alpha_{iD}}$$

где τ_{iD} – время жизни возбужденного состояния пиренового эксимера, τ_{iDA} – время жизни возбужденного состояния пиренового эксимера в присутствии СуЗ, α_i - предэкспоненциальные коэффициенты, $\langle \tau_{1/2D} \rangle$ - усредненное время жизни возбужденного состояния пиренового эксимера, $\langle \tau_{1/2DA} \rangle$ - усредненное время жизни возбужденного состояния пиренового эксимера в присутствии СуЗ.

Таблица 3 Времена жизни флуоресценции и эффективность FRET при переносе энергии от пиренов к сульфо-СуЗ.

Эксимер	α_1	$\tau_{1/2D}(\text{excimer}),$ нс	$\langle \tau_{1/2D} \rangle,$ нс	α_2	$\tau_{1/2DA}(\text{excimer}),$ нс	$\langle \tau_{1/2DA} \rangle,$ нс	$\lambda_{\text{max}}(\text{excimer})$	η_{FRET}
P1P1	0,17	(I) $12,0 \pm 3,2$	35,0	I 0,28	(I) $5,8 \pm 0,7$	27,8	515 нм	21%
	0,72	(II) $40,5 \pm 1,4$		II 0,49	(II) $40,9 \pm 1,1$			
P2P1	0,13	(I) $13,8 \pm 8,1$	30,3	I 0,25	(I) $4,5 \pm 0,7$	23,7	525 нм	22%
	0,77	(II) $32,8 \pm 2,0$		II 0,51	(II) $33,1 \pm 0,9$			
P1P2	0,22	(I) $11,2 \pm 11,2$	29,8	I 0,34	(I) $3,8 \pm 0,4$	16,0	520 нм	46%
	0,62	(II) $36,4 \pm 1,6$		II 0,29	(II) $30,4 \pm 1,4$			
P2P2	0,31	(I) $7,4 \pm 1,0$	23,1	I 0,38	(I) $4,8 \pm 0,5$	18,0	490 нм	22%
	0,54	(II) $32,1 \pm 1,2$		II 0,34	(II) $32,8 \pm 1,4$			

Удивительно, что при резонансном переносе происходит уменьшение времени жизни только одного состояния, в то время как второе остается неизменным. Это свидетельствует о том, что только один тип возбужденного комплекса выступает донором энергии; в то же время перенос энергии от второго эксимерного состояния является запрещенным. Истинная эффективность резонансного переноса энергии от пиренового эксимера была рассчитана из разницы времен жизни возбужденного состояния, учитывая предэкспоненциальные коэффициенты в аппроксимированном уравнении кривой амплитуд. Эффективности переноса энергии составили: 21% для P1P1, 22% для P2P1, 46% для P1P2 и 22% для P2P2 (табл. 3).

III. Синтез библиотеки азидопроизводных для твердофазной Cu(I)AAC модификации олигонуклеотидов

Ключевым методом пост-модификации синтетических олигонуклеотидов является медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение – Cu(I)AAC. Азид-алкиновая реакция применялась широко не только для создания «строительных блоков» и библиотек низкомолекулярных соединений в органической химии, но также и как метод модификации биополимеров, например, олигонуклеотидов. За счет своей простоты в исполнении, эффективности и быстроты протекания реакция стала рутинным инструментом в синтезе флуоресцентных ДНК зондов. Тем не менее, без детальной оптимизации реакция в значительной мере может протекать по побочному пути или вовсе с низкими выходами. До сих пор востребованы универсальные протоколы для модификации синтетических олигонуклеотидов Cu(I)AAC для увеличения производительности синтеза модифицированных олигонуклеотидов в академических и промышленных лабораториях. Мы постарались оптимизировать условия этой «клик»-реакции с олигонуклеотидами в твердофазном варианте с участием библиотеки востребованных функциональных производных. Твердофазный способ модификации олигонуклеотидов после синтеза в

отличие от жидкофазного варианта является более производительным и простым в исполнении, позволяет снизить время получения конъюгата олигонуклеотида и повысить его выход за счет сокращения промежуточных этапов выделения (**рис. 10**).

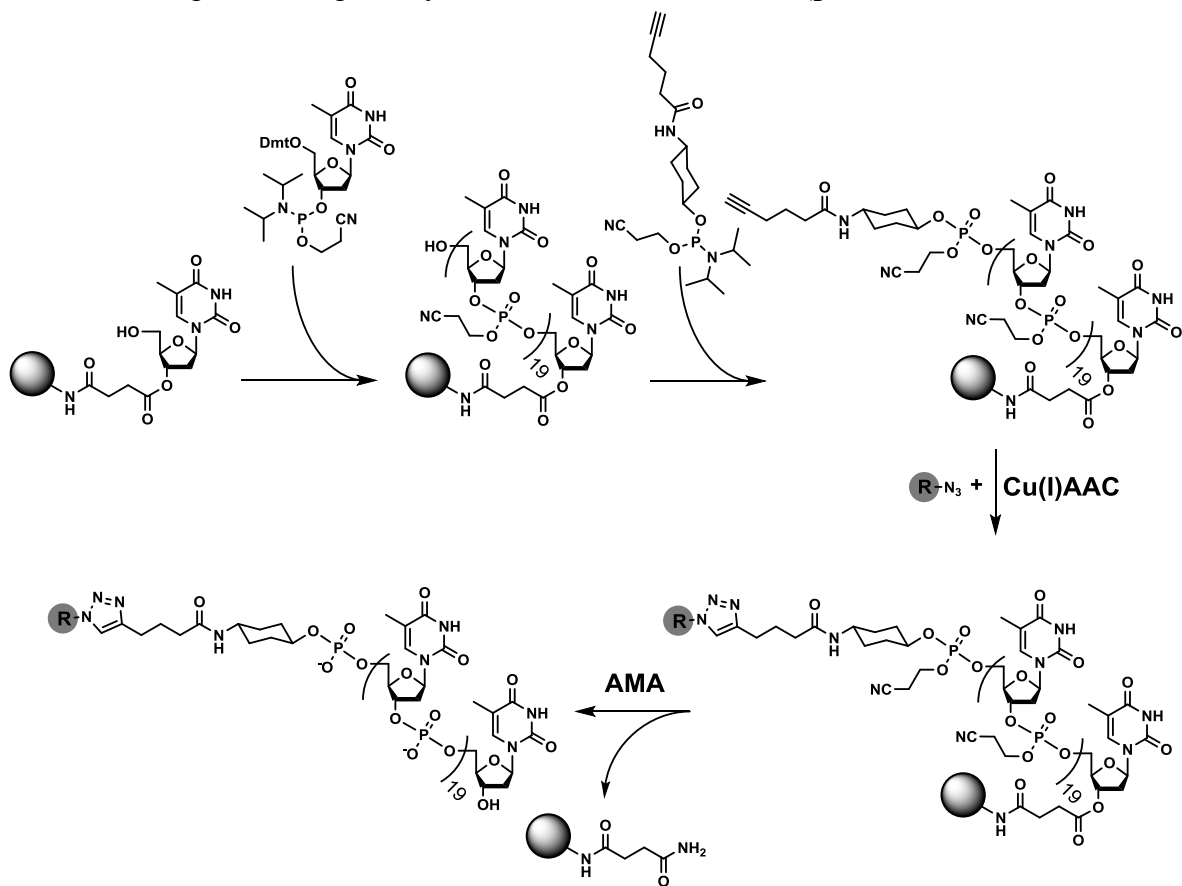


Рис. 10 Схема твердофазного синтеза, Cu(I)AAC модификации и деблокирования алкиновых олигонуклеотидов.

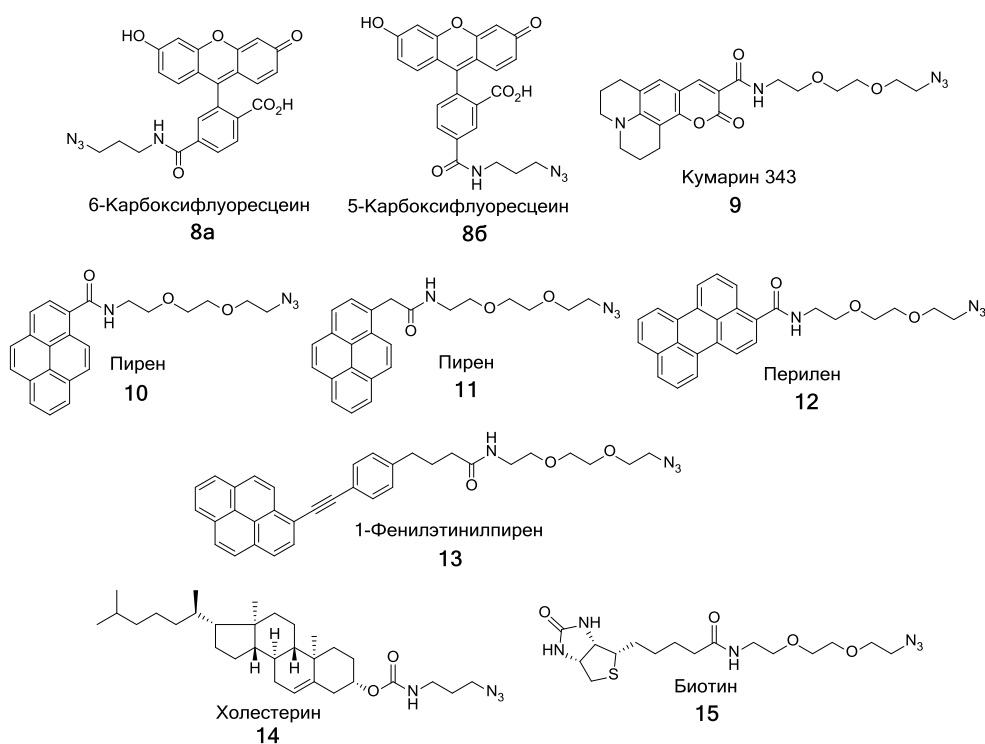


Рис. 11 Синтезированные функциональные азидопроизводные красителей и лигандов.

С этой целью мы отобрали и синтезировали ряд азидопроизводных, содержащих флуоресцентные красители **8–13**, а также биотин **15** и холестерин **14** (рис. 11). Поскольку следующая часть работы связана с подбором «голубого» флуоресцентного маркера для ПЦР зондов, в первую очередь мы провели синтез азидопроизводных красителей с испусканием в сине-зеленой области спектра. Среди них: производные пирена **10** и **11**, перилена **12**, фенилэтинилпирена **13**, кумарина 343 **9**, а также карбоксифлуоресцеинов **8a** и **8b** как наиболее популярных маркеров для ДНК-зондов.

Олигонуклеотидный синтез и модификация азидами проводилась сотрудниками Центра трансляционной медицины Сколковского института науки и технологий м.н.с. Валентиной Михайловной Фарзан и доцентом Тимофеем Сергеевичем Зацепиным, ими был протестирован ряд растворителей и катализаторов для Cu(I)AAC «клик»-реакции. В качестве модельной олигонуклеотидной последовательности выбрали олигодезокситимидин (dT)₂₀ с 5'-терминальным алкином. Типичные смеси растворителей *t*-BuOH/вода и DMSO/вода, используемые для Cu(I)AAC с участием олигонуклеотидов оказались чрезмерно вязкими средами для введения реагентов через инжектор в олигонуклеотидном синтезаторе. Далее прибегли к апротонным полярным растворителям: формамид, ацетонитрил, ДМСО, ДМФА и диметилацетамид. В качестве катализаторов были протестированы различные соли меди(I) и их комплексы: CuCl, Cu(MeCN)₄PF₆, CuI/DIPEA, CuCl×TBTA, CuBr×PhSMe, CuBr×TBTA и CuI×P(OEt)₃. Оптимальным катализатором для циклоприсоединения оказался комплекс CuI×P(OEt)₃, а растворителем – диметилацетамид. Производное кумарина **9** оказалось неустойчиво в основных условиях деблокирования олигонуклеотида, а целевой конъюгат составлял лишь меньшую часть реакционной смеси и не был выделен. Для получения конъюгата с кумарином реакцию проводили в растворе с очищенным алкиновым олигонуклеотидом. Остальные производные были получены с высокими выходами на твердой фазе с последующим деблокированием и охарактеризованы методами ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

IV. Фенилэтинилпирен (PEPy) в качестве флуоресцентного маркера зондов для кПЦР

Некоторые ПЦР-амплификаторы оснащены «голубым» каналом детекции флуоресцентного сигнала для увеличения мультиплексности анализа: Stratagene Mx3005P с возбуждением 350 нм и детекцией 440 нм и Qiagen Rotor-Gene Q с возбуждением 365 нм и детекцией 460 нм. Флуорофорами для «голубого» канала, как правило, выступают производные кумарина: AMCA, Alexa fluor 350, Pacific Blue и Dy-350. Они сильно уступают по яркости флуоресценции ксантеновым и цианиновым красителям, используемым для других каналов детекции: FAM, HEX, ROX, Cy5, Cy5.5. Кроме того, кумарины абсолютно не совместимы с фосфамидитным методом синтеза олигонуклеотидов. Это сильно ограничивает их применение в качестве олигонуклеотидных маркеров. В качестве альтернативы кумаринам мы протестировали 1-фенилэтинилпирен (PEPy) как флуоресцентный маркер для ДНК-зондов.

Для модификации олигонуклеотидов мы использовали азидопроизводное PEPy **13** и коммерчески доступные N-оксисукцинимидные эфиры флуорофоров AMCA и сульфированного Alexa Fluor 350 (Рис. 12).

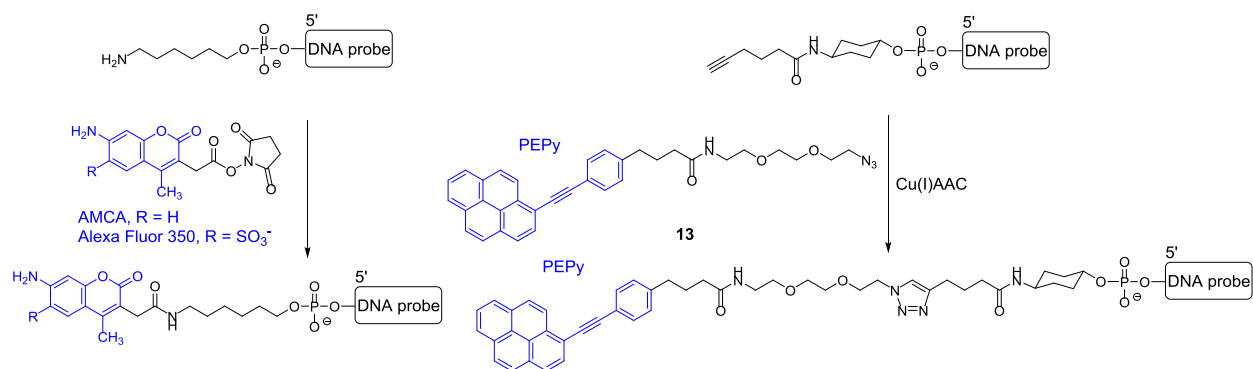


Рис. 12 Схема модификации синтезированных последовательностей NHS эфирами аминкумаринов АМСА и Alexa Fluor 350, а также РЕПу азидом по реакции Хьюсгена-Мельдаля-Шарплесса.

Мы изучили чувствительность флуоресценции РЕПу и АМСА в составе двухцепочечных ДНК к различным комбинациям соседних нуклеотидов, поскольку многие полиароматические углеводороды склонны к значительному тушению флуоресценции при взаимодействии с олигонуклеотидным каркасом. Были синтезированы олигонуклеотиды ODN 8X с 5'-флуорофорами АМСА или РЕПу: 5'-**Флуорофор-Х**АСССAACTGAAGCAGCA-3', где **Х** – А, Т, G или С; и гибридизовали их с частично или полностью комплементарными матрицами ODN 9Y: 3'-АСАААСАТА**Y**TGGGTGACTTCGTCGT-5', где **Y** – А, Т, G или С. Метка располагалась напротив свисающего конца олигонуклеотидной матрицы полностью или частично комплементарной зонду для симуляции эффекта взаимодействия зонда с ПЦР-амплификатами. Для флуоресцентных олигонуклеотидов и их дуплексов с матрицами определяли квантовые выходы флуоресценции, значения которых для РЕПу имели больший разброс и в среднем оказались ниже, чем для АМСА. При этом, учитывая молярные коэффициенты поглощения на максимуме длины волны возбуждения обоих красителей, яркость флуоресценции РЕПу ($\epsilon \times \Phi_f$) превышала АМСА в среднем в 2 раза (**рис. 13**).

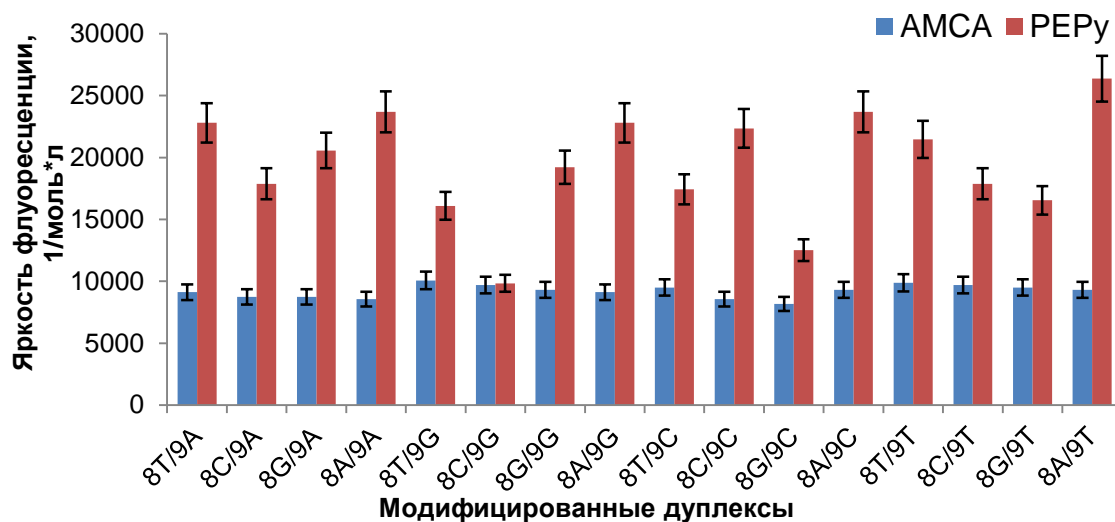


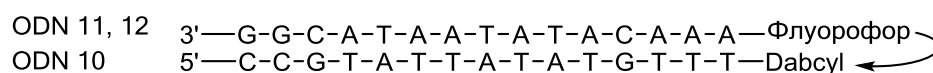
Рис. 13 Сравнение яркости флуоресценции ($\epsilon \times \Phi_f$) АМСА и РЕПу в составе дуплексов; зависимость от соседней пары нуклеотидов. Нуклеотиды дуплекса ближайšie к флуорофору в составе олигонуклеотидов обозначены в подписях.

Поскольку детекция в кПЦР происходит при повышенных температурах, мы изучили температурное тушение флуоресценции РЕПу и АМСА в составе модифицированных олигонуклеотидов. Так, при повышении температуры на 40°C, квантовый выход

флуоресценции РЕРу снизился на 27%, в то время как для АМСА он уменьшился более чем вдвое – на 55%, что дополнительно вносит вклад в тушение флуоресценции зондов в кПЦР.

Для применения флуоресцентных зондов для кПЦР важна не только яркая флуоресценция маркера, но и относительное увеличение интенсивности флуоресценции при гибридизации с мишенью. Мы также изучили эффективность тушения флуорофоров РЕРу и АМСА в составе модельных олигонуклеотидов с преобладанием Фёрстеровского и контактного механизма тушения. (рис. 14). В качестве темного гасителя флуоресценции использовали азокраситель – Dabcyl. Эффективности тушения для РЕРу практически совпадают с АМСА, при контактном тушении - 77% (РЕРу)/87% (АМСА), и с преобладанием Фёрстеровского механизма - 56% (РЕРу)/52% (АМСА). Таким образом, по эффективности тушения оба флуоресцентных маркера практически идентичны друг другу.

а) Контактное тушение (I)



б) Тушение по механизму FRET (II)

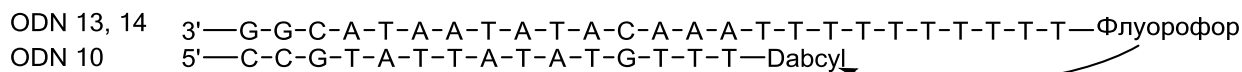


Рис. 14 Схематическое изображение расположения красителя и тушителя в дуплексе, соответствующее контактному и Фёрстеровскому механизму тушения.

Доказав преимущество РЕРу по яркости флуоресцентного сигнала по сравнению с кумарином АМСА, мы апробировали РЕРу-флуорофор в зондах в сравнении с кумариновыми аналогами в кПЦР. ПЦР в реальном времени проводила м.н.с. лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора Веселова Ольга Александровна. В качестве мишени выступали клонированные VP4 и VP7 фрагменты генома Р и G ротавирусов в векторе рGem-t.

Нами был проведен дизайн шести шпилечных TaqMan зондов, комплементарных мишени, содержащих маркеры 5'-РЕРу, 5'-Alexa Fluor 350 и 5'-АМСА и тушитель флуоресценции 3'-Dabcyl. Анализируя нормализованные ПЦР-графики после проведения ПЦР, мы сравнивали уровень плато фоновой и конечной флуоресценции. Регистрация флуоресценции проводилась при 55°C. Для всех зондов с РЕРу фоновая флуоресценция оказалась ниже, а конечная значительно выше. Сниженный фоновый сигнал для РЕРу может быть результатом более тесного гидрофобного взаимодействия полиароматического флуорофора с азобензольным тушителем. Поскольку увеличение флуоресцентного сигнала для РЕРу превосходит АМСА-меченные зонды в среднем в 2 раза, это имеет ключевое значение для чувствительности ДНК-зонда. Разница необходимого количества флуоресцентных зондов для проведения анализа пропорциональна разнице фоновой и конечной флуоресценции, т.е. 5'-РЕРу-меченных зондов необходимо в несколько раз меньше, чем меченных кумаринами для того же уровня флуоресценции. Кроме того, значения пороговых циклов - C_t для РЕРу оказались ниже на 2,5-6 значения, чем для АМСА. Это означает, что количество определяемой последовательности ДНК при прочих равных условиях для зондов с РЕРу и АМСА отличается в $n \times ((1-2)^{2.5} - (1-2)^6)$ раз, где $n = 1-2$ – эффективность ПЦР цикла, т.е. вплоть до 64 раз.

V. Конъюгация иммуноглобулинов с олигонуклеотидами

Моноклональные антитела и конъюгаты на их основе обрели широчайшее применение в медицине и молекулярной биологии: терапии заболеваний, серологической диагностике, а также в лабораторных методах анализа. В последние годы для целей конъюгации белков активно разрабатываются методы «клик»-химии. К сожалению, для контроля протекания мечения функциональными группами иммуноглобулинов приходится прибегать к дополнительным стадиям и анализам, а конечные конъюгаты с олигонуклеотидами, как правило, и вовсе не анализируются перед применением. Соединение олигонуклеотидов с иммуноглобулинами и прочими белками через ковалентную связь является наиболее надежным и перспективным подходом конъюгации, однако процедуры такого связывания недостаточно проработаны на настоящий момент и требуют детального рассмотрения.

Для ковалентного введения азидогрупп в иммуноглобулины по остаткам лизинов нами была предложена структура кросс-сшивающего линкера **16**, содержащего в своем составе цианиновый краситель сульфо-Су5 (рис. 15). Флуоресцентный краситель Су5 обладает высоким коэффициентом молярного поглощения в красной области ($\epsilon \sim 250000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ при 650 нм), примерно таким же, как и полноразмерные антитела человека в ультрафиолетовой области ($\epsilon \sim 204000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ при 280 нм). Кроме того, полосы поглощения белковых антител и Су5 не перекрываются и сильно отстоят друг от друга в спектральном диапазоне, что позволяет количественно оценивать степень мечения антитела и, соответственно, количество введенных азидогрупп в пересчете на одну молекулу антитела. Такой подход обеспечивает простой анализ стехиометрии полученного конъюгата без дополнительных функциональных тестов и титрований.

Для конъюгации иммуноглобулинов нами был выбран вариант азид-алкинового циклоприсоединения не требующий медного катализатора (SPAAC), поскольку присутствие солей меди может привести к денатурации антитела и выпадению его в осадок. Протекание реакции в отсутствие солей Cu(I) достигается за счет фрагмента ацетилен в составе напряженного восьмичленного (реже семичленного) цикла. Исходя из схем синтеза возможных производных циклоалкинов, их реакционной способности и стабильности, нами был выбран и синтезирован активированный эфир азидабензоциклооктина (ADIBO NHS) **15**. Далее его применяли для пост-модификации олигонуклеотида.

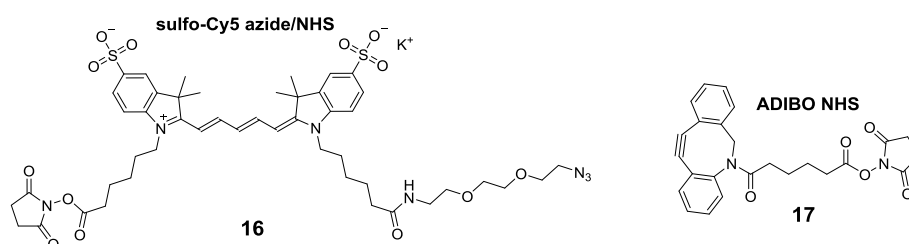


Рис. 15 Кросс-сшивающие реагенты сульфо-Су5 азид/NHS эфир и циклооктин/NHS эфир.

Соединение **16** растворимо в воде и не склонно к неспецифическим гидрофобным взаимодействиям с белковыми глобулами. Иммуноглобулин G модифицировали соединением **16** в PBS при слабощелочном pH 7,4 (рис 16).

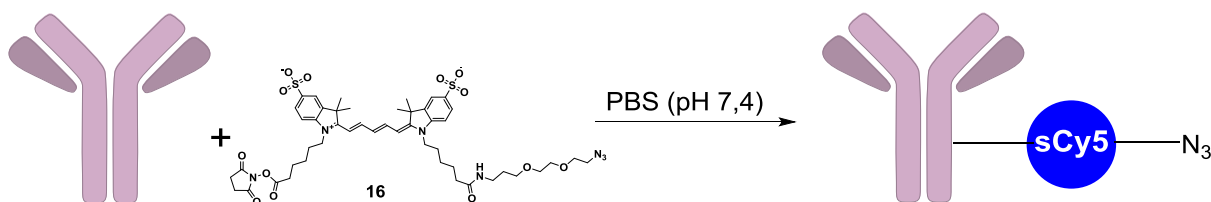


Рис. 16 Формальная схема ковалентной модификации иммуноглобулина сульфо-Су5 азид/NHS эфиром.

Таким образом, введение остатка **16** через образование амидной связи с белком происходит в мягких условиях: инкубация в физиологическом буфере при комнатной температуре в течение нескольких часов. Затем модифицированное антитело осаждали равным объемом 4М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и отделяли от непрореагировавшего красителя гель-хроматографией на колонках NAP-5 или NAP-10 и концентрировали ультрафильтрацией на мембранных фильтрах. После очистки иммуноглобулина степень протекания модификации оценивали по соотношению максимумов полос поглощения на 280 нм и 650 нм в УФ/видимом диапазонах. Поскольку Су5 обладает небольшим поглощением в УФ области (коэффициент молярного поглощения составляет $9200 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ при 280 нм) для количественного определения остатков азидогрупп использовали формулу:

$$\eta = \frac{A_{650} \times 204000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}}{230000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1} \times (A_{280} - \frac{9200 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}}{230000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}} \times A_{650})} = 0,887 A_{650} / (A_{280} - 0,04 \times A_{650})$$

Была проведена серия экспериментов, в которой 200 мкг иммуноглобулина G человека обрабатывали реагентом **16** в различных соотношениях: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25 и 1:50. После выделения конъюгатов степень протекания мечения оценивали по спектрам поглощения в УФ и видимой областях спектра. Как видно на **рис. 17** эффективность модификации уменьшается при использовании больших избытков Су5-реагента **16**; очевидно, это связано с ограниченным количеством доступных аминокетильных групп на поверхности белковой глобулы или с изменением заряда белковой глобулы.

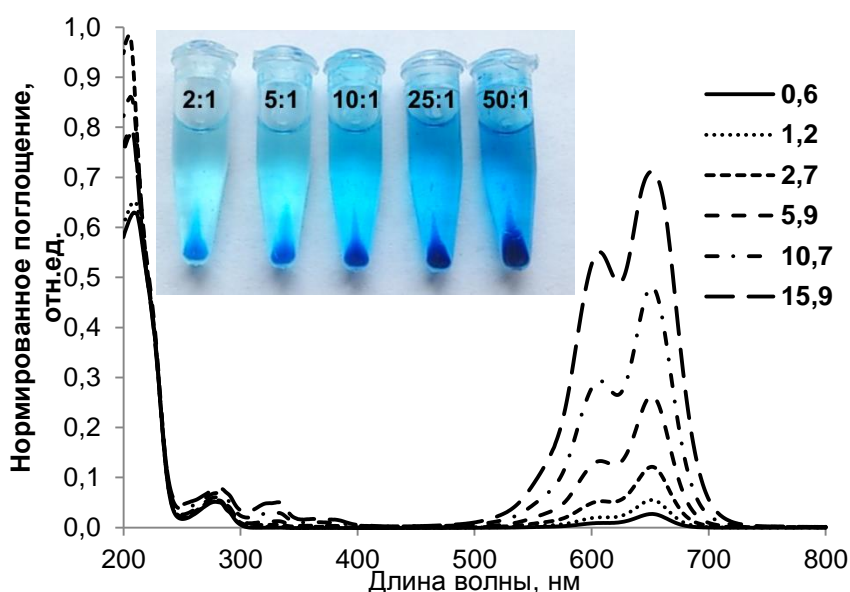


Рис. 17 Спектры поглощения антитела меченного активированным эфиром Су5 **16**. Врезка: фотография осажденных конъюгатов антитела после обработки реагентом **16**.

При введении одного фрагмента сульфо-Cy5 иммуноглобулин приобретает два дополнительных отрицательных заряда, что сказывается на изоэлектрической точке белка. Обработывая антитело несколькими эквивалентами активированного эфира **16**, мы анализировали меченные Cy5 антитела при помощи высокоэффективной ионообменной хроматографии на колонке TSK gel DEAE-5PW (7,5×75 мм) элюируя градиентом ацетата натрия в Трис-боратном буфере. ВЭЖХ профили нативного антитела и его конъюгаты наложены и приведены на **рис. 18**.

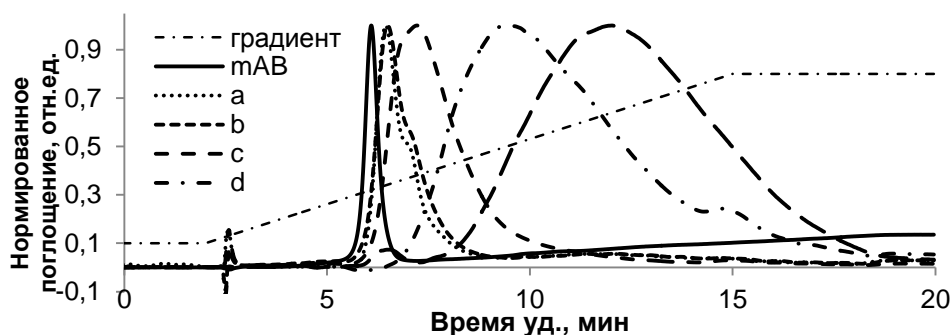


Рис. 18 Хроматограммы нативного и меченого моноклонального антитела, содержащего разное количество метки Cy5 **16** а) 0,6 экв. **16**, б) 1,2 экв. **16**, в) 2,7 экв. **16**, г) 5,9 экв. **16**, е) 10,7 экв. **16**. Раствор А: 20 мМ трис-боратный буфер, pH 8,5, раствор Б: 2,0 М ацетат натрия в 20 мМ трис-боратном буфере, pH 8,5. Градиент 0–2 мин 90% А/10% Б → 2–15 мин от 10% до 80% Б, → 80% Б/20% А.

Проведя мечение иммуноглобулинов и оценив степень модификации, мы перешли непосредственно к конъюгации с олигонуклеотидом. Мы выбрали короткий синтетический олигонуклеотид (dT)₂₀ с введенной по 5'-положению аминогруппой и 3'-концевым алкином, планируя поэтапно ввести флуоресцентный маркер сульфо-Cy3 в 3'-положение через азидопроизводное в ходе Cu(I)AAC, затем ацилировать 5'-аминогруппу NHS эфиром ADIBO **15**. Очищенный олигонуклеотид меченный 3'-сульфо-Cy3 обрабатывали избытком активированного эфира **15** (ADIBO NHS) и после осаждения раствором перхлората лития в ацетоне продукт без дополнительной очистки вводили в реакцию с модифицированным иммуноглобулином **G** (**рис. 19**). Азид-алкиновое циклоприсоединение с участием напряженного циклооктина (SPAAC) протекает избирательно и быстро не требуя катализатора и инертной атмосферы. Для полноты протекания SPAAC реакции между олигонуклеотидом и белком мы использовали 5-кратный мольный избыток модифицированного олигонуклеотида по отношению к азидогруппе в составе меченого антитела. Конъюгацию проводили при +37°C в трис-боратном буфере в течение нескольких часов. Реакционную смесь обрабатывали аналогичным образом, как и в случае мечения нативного антитела, а продукт конъюгации олигонуклеотида и белка выделяли ультрафильтрацией.

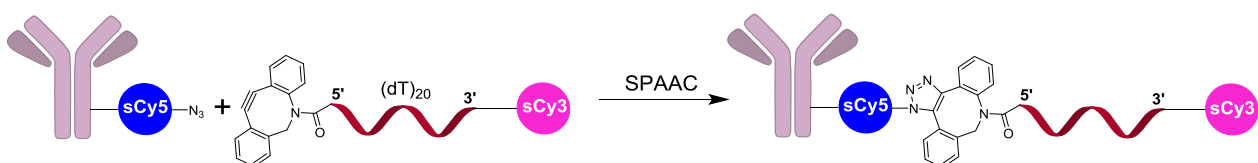


Рис. 19 Схема конъюгации иммуноглобулина с олигонуклеотидом при помощи кросс-линкеров **15** и **16**.

Наличие двух цианиновых красителей в составе конъюгата позволяет оценить степень протекания реакции между антителом и олигонуклеотидом по соотношению максимумов поглощения в видимой области. Мы также наблюдали смещение максимума конъюгированного иммуноглобулина на 270 нм, а его спектр соответствует сумме двух профилей поглощения: меченного Cy5 антитела и олигонуклеотида с Cy3 до конъюгации (рис. 20 а).

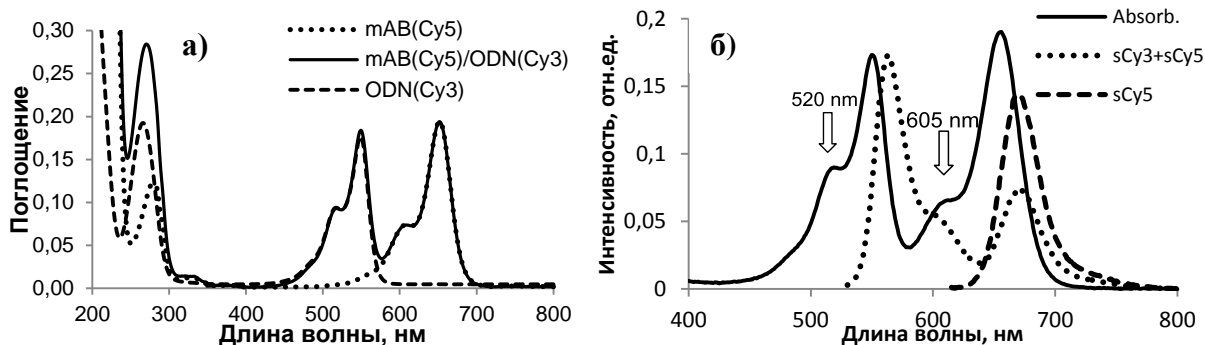


Рис. 20 а) Спектры поглощения олигонуклеотида с сульфо-Cy3, иммуноглобулина, меченного Cy5 **16** их ковалентного конъюгата. **б)** Фрагмент спектра поглощения цианиновых красителей в составе конъюгата олигонуклеотида (dT)₂₀ с иммуноглобулином и спектры их флуоресценции при возбуждении на длинах волн 520 нм и 605 нм.

Кроме того, Cy3/Cy5 это удачная FRET пара, которая неоднократно применялась для изучения конъюгации биомолекул. Одноцепочечный олигонуклеотид, длиной в 20 нуклеотидов позволяет переносить часть энергии возбуждения от Cy3 на Cy5, т.о. в спектре испускания такой системы мы должны наблюдать две полосы испускания обоих красителей при возбуждении Cy3. Действительно, при возбуждении флуоресценции на длине волны 605 нм, мы регистрировали спектр Cy5, а при 520 нм, две полосы Cy3 и Cy5, при том, что Cy5 не возбуждается на этой длине волны (рис. 20 б).

Эта тенденция сохраняется также при разном соотношении олигонуклеотидного фрагмента к иммуноглобулину. Так, нами была проведена серия экспериментов по конъюгации 3'-Cy3-олигонуклеотидов с антителами, содержащими различное количество остатков Cy5 с азидогруппами (рис. 21 а). К сожалению, реакция протекала количественно только с участием иммуноглобулинов с небольшой степенью модификации, так, не удавалось ввести более трех остатков олигонуклеотидов к иммуноглобулину, даже если количество азидогрупп на одну молекулу белка более 10. Это может быть связано в первую очередь со стерическими затруднениями, а также изменением общего заряда конъюгата. Тем не менее, денатурации белка и выпадения осадка не наблюдалось ни в одной из реакций. На рис. 21 а приведены спектры поглощения выделенных конъюгатов с одинаковой концентрацией иммуноглобулина.

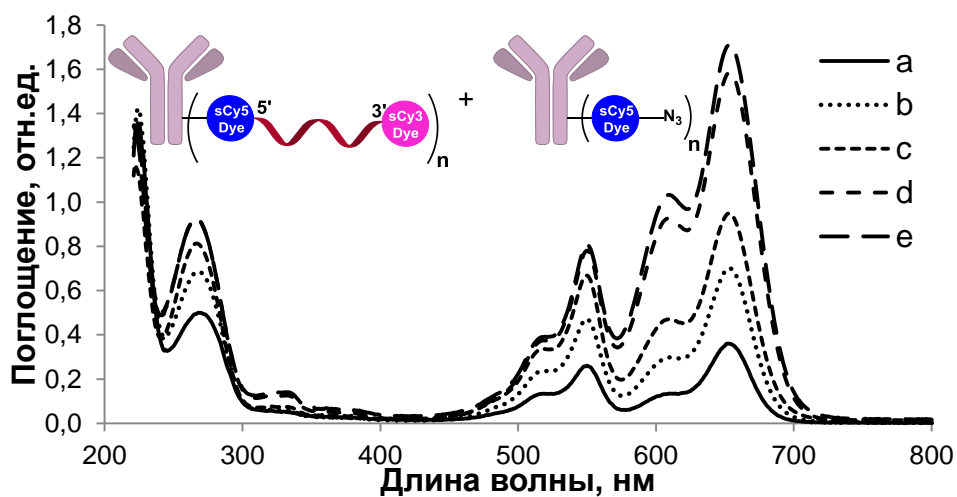


Рис. 21 Спектры поглощения выделенных конъюгатов иммуноглобулина с олигонуклеотидами. Кривые соответствуют конъюгатам a, b, c, d, e, содержащим 0.6, 1.2, 2.7, 5.9 и 10.7 азидогрупп на молекулу антитела соответственно.

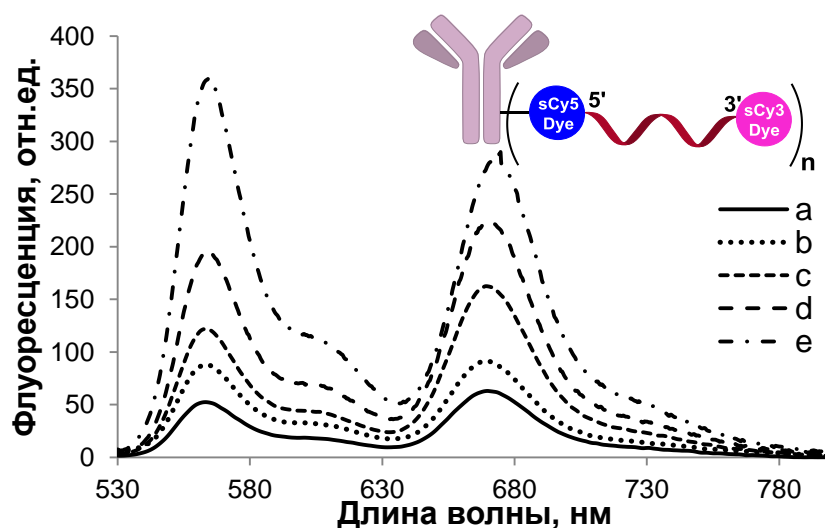


Рис. 22 Спектры флуоресценции конъюгатов иммуноглобулинов и олигонуклеотида d(T)₂₀, меченные Cy3 и Cy5 на длине волны возбуждения 520 нм: а) n = 0.6 экв, б) n = 1.2 экв, в) n = 2.7 экв, г) n = 5.9 экв, д) n = 10.7 экв.

Таким образом, была отработана методика контролируемого введения азидогрупп в молекулу иммуноглобулина. Оценку стехиометрии меченого антитела легко проводить спектрофотометрически. Также на модельной системе отработаны условия ковалентного присоединения последовательности олигонуклеотида к белковой глобуле в мягких условиях, не приводящих к ее денатурации.

Выводы:

1. На основе (*R*)-4-амино-2,2-диметилбутан-1,3-диола получены реагенты для введения пиреновых флуорофоров и тушителя Dabcyl в ДНК-зонды типа «молекулярный маяк». Для эксимерных зондов показана возможность варьирования λ_{\max} (475–510 нм), Стоксова сдвига (125–160 нм) и интенсивности эксимерной полосы подбором мономерного состава пиреновой метки.
2. Предложена донорно-акцепторная пара для олигонуклеотидных зондов - пиреновый эксимер/Су3. Подобрано оптимальное расположение донора и акцептора для максимальной эффективности переноса энергии при гибридизации двух зондов на комплементарной матрице.
3. Получена библиотека азидопроизводных на основе флуоресцентных красителей, биотина и холестерина. Определены оптимальные условия твердофазной Cu(I)AAC-модификации олигонуклеотидов с применением данных реагентов.
4. В качестве нового флуоресцентного маркера зондов для «голубого» канала детекции в кПЦР предложен 1-фенилэтинилпирен (PEPy) как альтернатива кумариновым флуорофорам. В TaqMan-зондах PEPy показал увеличение флуоресцентного сигнала в 2 раза по сравнению с красителем AMCA и снижение значения порогового цикла (C_t) на 2,5-6 ед.
5. Синтезирован реагент на основе красителя Су5 для контролируемого введения азидогрупп в белки. Разработан метод SPAAC-конъюгации олигонуклеотидов с иммуноглобулинами с простой и количественной спектрофотометрической оценкой соотношения белок/ДНК.

Использованные сокращения:

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

кПЦР (qPCR) - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

НК – нуклеиновая кислота

ОДН (ODN) - олигодезоксирибонуклеотиды

ADIBO - азидабензоциклооктин

Cu(I)AAC – медь (I)-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение

DEAE - диэтиламиноэтил

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

FRET – резонансный перенос энергии Фёрстера

NHS – *N*-оксисукцинимид

PBS – натрий-фосфатный буфер

SPAAC – азид-алкиновое циклоприсоединение промотируемое напряжением

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Aparin I.O.**, Farzan V.M., Veselova O.A., Chistov A.A., Podkolzin A.T., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Formanovsky A.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. 1-Phenylethynylpyrene (PEPy) as a novel blue-emitting dye for qPCR assay. *Analyst*, **2016**, *141* (4), 1331–1338.
2. Farzan V.M., **Aparin I.O.**, Veselova O.A., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Cy5/BHQ dye–quencher pairs in fluorogenic qPCR probes: effects of charge and hydrophobicity. *Anal. Meth.*, **2016**, *8* (29), 5826–5831.
3. Tsybulsky D.A., Kvach M.V., Ryazantsev D.Y., **Aparin I.O.**, Stakheev A.A., Prokhorenko I.A., Martynenko Y.V., Gontarev S.V., Formanovsky A.A., Zatsepin T.S., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zavriev S.K. Molecular beacons with JOE dye: Influence of linker and 3' couple quencher. *Mol. Cell. Probes*, **2016**, *30* (5), 285–290.
4. **Aparin I.O.**, Proskurin G.V., Golovin A.V., Ustinov A.V., Formanovsky A.A., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Fine tuning of pyrene excimer fluorescence in molecular beacons by alteration of the monomer structure. *J. Org. Chem.*, **2017**, *82* (19), 10015–10024.
5. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., **Aparin I.O.**, Brylev V.A., Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse *N*-acetylgalactosamine clusters. *Bioconjugate Chem.*, **2017**, *28* (10), 2599–2607.

Тезисы конференций и симпозиумов:

1. **Aparin I.O.**, Chistov A.A., Prokhorenko I.A., Stepanova I.A., Veselova O.A., Ustinov A.V., Formanovsky A.A., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Blue-emitting fluorescent azides for DNA labeling. XVI th Symposium «Chemistry of Nucleic Acid Components», Cesky Krumlov, Czech Republic, June 8–13, 2014, *Collection Symp. Ser.*, **2014**, *14*, 222–224.
2. Прохоренко И.А., Игнатъева Н.В., **Апарин И.О.**, Пестов Н.Б., Устинов А.В., Рязанцев Д.Ю., Формановский А.А., Коршун В.А. Ковалентные конъюгаты иммуноглобулинов и ДНК. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск, 12–17 июля 2015 г. Материалы симпозиума, с. 261.
3. **Апарин И.О.**, Берлина Я.Ю., Скоблов Ю.С., Скоблов М.Ю., Власик Т.Н., Коршун В.А., Формановский А.А., Прохоренко И.А. Реагент для контролируемого синтеза ковалентных конъюгатов иммуноглобулинов и ДНК. Международная конференция "Химическая биология" посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре, Новосибирск, 24-28 июля, 2016 г. Материалы симпозиума, с. 196.
4. **Апарин И.О.**, Прохоренко И.А., Коршун В.А., Формановский А.А. Флуоресцентные кросс-сшивающие реагенты для контролируемой функционализации моноклональных антител. XXVIII Зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", ИБХ РАН, Москва, Россия, 8–11 февраля 2016 г., с. 159.
5. Zatsepin T.S., **Aparin I.O.**, Proskurin G.V., Golovin A.V., Korshun V.A. Fine tuning of pyrene excimer fluorescence in molecular beacons by alteration of the monomer structure. 7th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology. Queens' College, Cambridge, UK, September 3–6, 2017, Book of abstracts, 162.