

Фосфорамидные бензимидазольные олигонуклеотиды в составе несовершенных комплексов с ДНК: гибридизационные свойства и эффективность удлинения в ходе ПЦР

Голышев В.^{1*}, Морозова Ф.^{1, 2}, Бердюгин А.^{1, 2}, Ломзов А.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* golyshevvector@gmail.com

Ключевые слова: аналоги нуклеиновых кислот; гибридизационные свойства; физико-химические свойства; одонуклеотидные несоответствия; ПЦР; праймеры; дуплексы

Мотивация и цель: С ростом требований к высокочувствительным и специфичным методам молекулярного обнаружения, совершенствовались методы диагностики, что привело к последовательному развитию эффективной техники детекции нуклеиновых кислот – полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для повышения специфичности и чувствительности в составе праймеров для ПЦР используют различные типы модификаций нуклеотидов. Одним из перспективных аналогов НК для этого могут выступать фосфорамидные азольные олигонуклеотиды (ФАО), метод автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза которых был впервые недавно предложен в ИХБФМ СО РАН [1]. Уже начаты исследования их физико-химических [2] и молекулярно-биологических [3] свойств. Целью данной работы являлось изучение физико-химических свойств комплексов ДНК с новым классом модифицированных по межнуклеотидному фосфатному остатку дезоксирибонуклеиновых кислот – фосфорамидных бензимидазольных олигонуклеотидов, в которых будут присутствовать одонуклеотидные замены, а также исследование эффективности и специфичности удлинения модифицированных цепей, что послужит базисом для их дальнейшего применения.

Методы и алгоритмы: На первом шаге исследований использовали метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала в стандартных условиях (1 M NaCl, 10 mM (CH₃)₂AsO₂Na, pH 7.2) и в условиях, приближенных к условиям ПЦР (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.2), в большинстве экспериментов использовали суммарную концентрацию олигонуклеотидов 10 мкМ. Для этого использовали спектрофотометр Agilent Cary 3500 с 8-мисекционным держателем с Пельтье элементом для температурного контроля. Для анализа структуры модельных нативных и модифицированных комплексов были записаны спектры кругового дихроизма (КД) на спектрополяриметре Jasco J-600. Для изучения субстратных свойств ФАО/ДНК комплексов при процессировании их ДНК-зависимой ДНК-полимеразой использовали термоциклер Eppendorf Mastercycle Classic со следующей процедурой для одного цикла: состоящего из двух стадий: отжига – 95 °C – 2 минуты, 30 °C – 1 минута и элонгации при 37 °C в течении 7 минут. Электрофоретический анализ продуктов производили в 15 %

денатурирующем ПААГ. Сканирование гелей проводили на VersaDoc VN 4000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) используя канал для FAM.

Результаты: В рамках данного исследования были изучены физико-химические свойства тринадцатизвенных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие одну N-бензимидазольную модификацию в концевой или предконцевой межнуклеотидной фосфатной группе с 3'-конца, формирующих комплексы с 22-звенными ДНК цепями. Формируемые ими комплексы были комплементарными или содержали мисматч во втором положении с 3'-конца короткой цепи. Было показано, что процесс образования таких комплексов может быть описан в рамках приближения модели двух состояний. Введение бензимидазольной модификации значительно снижает термическую стабильность таких комплексов в стандартных условиях (1M NaCl), но в условиях, близких к физиологическим такого снижения практически не наблюдается. Введение N-бензимидазольной модификации в первый фосфатный остаток приводит к меньшей дестабилизации дуплексов, чем ее введение во 2 положение от 3'-конца короткой цепи.

Было показано, что структура комплексов нативных и модифицированных комплексов без мисматчей практически совпадают и соответствуют В-форме двойной спирали ДНК. Наличие однонуклеотидных несоответствий и модификаций не приводит к заметному нарушению спиральной формы комплекса.

На следующем этапе была исследована скорость и эффективность элонгации тринадцатизвенных ФАО праймеров в комплексе с 22-звенной ДНК-матрицей как для систем с мисматчами, так и комплементарных комплексов при процессировании их ДНК-зависимой ДНК-полимеразой. Была изучена кинетика удлинения праймера на основании чего выбраны оптимальные условия анализа. Анализ продуктов удлинения ФАО-праймеров *Taq* ДНК-полимеразой позволил определить важные для действия фермента положения ФА-групп в праймере замедляющие или препятствующие удлинению олигомера. В частности, модификация первого межнуклеотидного фосфатного остатка с 3'-конца праймера приводила к заметному снижению эффективности его удлинения, в то время как модификация второго фосфата в меньшей степени ингибировала процесс элонгации как для комплементарных комплексов, так и комплексов с мисматчем.

Выводы: Таким образом, изучены физико-химические и субстратные свойства ФАО/ДНК комплексов (как имеющих в предконцевом положении однонуклеотидные несоответствия, так и комплементарные системы) при процессировании их ДНК-зависимой ДНК-полимеразой. Показано, что наличие бензимидазольной фосфорамидной модификации в первом межнуклеотидном фосфатном остатке от 3'-конца практически полностью ингибирует процесс элонгации в системах с однонуклеотидными несоответствиями.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ № 23-74-01116.

Phosphoramidate benzimidazole oligonucleotides in imperfect complexes with DNA: hybridization properties and elongation efficiency during PCR

Golyshev V.^{1,*}, Morozova F.^{1,2}, Berdugin A.^{1,2}, Lomzov A.¹

¹ Institute of chemical biology and fundamental medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* golyshevvector@gmail.com

Key words: nucleic acid analogs; hybridization properties; physicochemical properties; single nucleotide mismatches; PCR; primers; duplexes

Motivation and Aim: With the growing requirements for highly sensitive and specific methods of molecular detection, diagnostic methods have been improved, which led to the consistent development of an effective technique of nucleic acid detection – polymerase chain reaction (PCR). In order to increase specificity and sensitivity, various types of modifications of nucleotide derivatives are used as primers for PCR. One of the promising analogs of NA for this purpose can be phosphoramidate azole oligonucleotides (PAO), the method of automated solid-phase phosphoramidate synthesis of which was recently proposed for the first time in ICBFM SB RAS [1]. Studies on their physicochemical [2] and molecular biological [3] properties have already been initiated. The aim of this work was to study the physicochemical properties of DNA complexes with a new class of deoxyribonucleic acids – phosphoramidate benzimidazole oligonucleotides modified on the inter-nucleotide phosphate residue, in which single-nucleotide substitutions will be present, as well as to study the efficiency and specificity of the modified chains elongation, which will serve as a basis for their further application.

Methods and Algorithms: In the first step of the research we used the method of thermal denaturation with optical signal registration under standard conditions (1 M NaCl, 10 mM (CH₃)₂AsO₂Na, pH 7.2) and under conditions close to PCR conditions (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM (CH₃)₂AsO₂Na, pH 7.2); in most experiments we used the total oligonucleotide concentration of 10 μM. For this purpose, an Agilent Cary 3500 spectrophotometer with an 8-section Peltier element for temperature control was used. To analyze the structure of model complexes of native and modified complexes, circular dichroism (CD) spectra were recorded on a Jasco 600 spectropolarimeter. To study the substrate properties of FAO/DNA complexes during their processing by DNA-dependent DNA polymerase, an Eppendorf Mastercycle Classic thermocycler was used with the following procedure for one cycle: consisting of two stages: annealing at 95 °C for 2 minutes, 30 °C for 1 minute and elongation at 37 °C for 7 minutes. Electrophoretic analysis of the products was performed in denaturing 15 % PAGE. Gels were scanned on a VersaDoc VH 4000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the FAM channel.

Results: This study investigated the physicochemical properties of complexes of thirteen-stranded oligodeoxyribonucleotides containing a single N-benzimidazole modification in the terminal or preterminal phosphate group at the 3'-end with 22-stranded DNA strands. The complexes formed by them were complementary or contained mismatches in the second position from the 3'-end of the short chain. It was shown that the process of formation of such complexes can be described within the

approximation of the two-state model. The introduction of benzimidazole modification significantly reduces the thermal stability of such complexes under standard conditions (1M NaCl), but under conditions close to physiological conditions such reduction is practically not observed. The introduction of N-benzimidazole modification into the first phosphate residue leads to less destabilization than introduction into position 2 from the 3'-end of the short chain.

It was shown that the structure of the complexes of native and modified complexes without mismatches practically coincide and correspond to the B-form of the DNA double helix. The presence of single-nucleotide mismatches and modifications both 5' and 3' away from it does not lead to a noticeable disruption of the helical shape of the complex.

At the next stage, the rate and efficiency of elongation of thirteen-stranded FAO primers in complex with 22-stranded DNA primers were investigated for both the systems with mismatches and complementary complexes when they were processed by DNA-dependent DNA polymerase. The kinetics of primer elongation was studied and optimal conditions of analysis were chosen. The analysis of PAO-primer elongation products by Taq DNA polymerase allowed us to determine the positions of PA-groups in the primer that are important for the enzyme action and slow down or prevent oligomer elongation. In particular, modification of the first internucleotide phosphate residue at the 3'-end of the primer led to a marked decrease in its elongation efficiency, while modification of the second phosphate inhibited the elongation process to a lesser extent for both complementary complexes and complexes with mismatch.

Conclusion: Thus, we have studied the physicochemical and substrate properties of PAO/DNA complexes (both those with single-nucleotide mismatches in the preterminal position and complementary systems) when they are processed by DNA-dependent DNA polymerase. It was shown that the presence of a benzimidazole phosphoramidate modification in the first inter-nucleotide phosphate residue from 3' almost completely inhibits the elongation process in systems with single-nucleotide mismatches.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation. (No. 23-74-01116).

Список литературы/References

1. Vasilyeva S.V. et al. Synthesis of oligonucleotides carrying inter-nucleotide N-(Benzoazole)-phosphoramidate moieties. *ACS Omega*. 2022;8(1):1556-1566. doi 10.1021/acsomega.2c07083
2. Golyshev V.M. et al. Properties of phosphoramidate benzoazole oligonucleotides (PABAOs). I. Structure and hybridization efficiency of N-benzimidazole derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;693:149390. doi 10.1016/j.bbrc.2023.149390
3. Chubarov A.S. et al. Phosphoramidate azole oligonucleotides for single nucleotide polymorphism detection by PCR. *Int J Mol Sci*. 2024;25(1):617. doi 10.3390/ijms25010617