

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-ФРАГМЕНТОВ С ВКЛЮЧЕНИЯМИ ТИМИДИНГЛИКОЛЯ

© 2008 г. Е. А. Федотова*, Ф. Ян*, Е. А. Кубарева**,#, Е. А. Романова**, А. С. Проценко***, М. Б. Вирясов*, Т. Гианик****, Т. С. Орекция*

*Химический факультет и **НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

119992, Москва, Воробьевы горы

***Пуцинский государственный университет,

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,

142290, Пушкино Московской обл.

****Университет Коменского, Братислава, Словакия

Поступила в редакцию 26.04.2007 г. Принята к печати 16.05.2007 г.

Описан химический синтез набора модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих один или два остатка тимидингликоля (5,6-дигидро-5,6-дигидрокси-тимидина) – основного продукта окислительного повреждения ДНК. Методом УФ-спектроскопии изучена термическая устойчивость ДНК-дуплексов с включениями остатков тимидингликоля. Показано, что введение даже одного остатка тимидингликоля в состав дуплекса приводит к его существенной дестабилизации. Впервые получены данные о взаимодействии ДНК-метилтрансфераз и эндонуклеаз рестрикции типа II с ДНК-лигандами, содержащими в своем составе окисленный остаток тимина. Установлено, что введение в центральную вырожденную позицию участка узнавания эндонуклеазы рестрикции SsoII остатка тимидингликоля приводит к повышению начальной скорости гидролиза модифицированного дуплекса по сравнению с немодифицированным, а сродство C5-цитозиновой метилтрансферазы SsoII к ДНК-дуплексу с тимидингликолем в 2 раза выше, чем к немодифицированному субстрату. Однако такая модификация ДНК-лиганда препятствует его метилированию.

Ключевые слова: тимидингликоль, модифицированные олигонуклеотиды, ДНК-метилтрансфераза SsoII, эндонуклеаза рестрикции SsoII.

ВВЕДЕНИЕ

Тимидингликоль (5,6-дигидро-5,6-дигидрокси-тимидин) является основным продуктом окислительного повреждения ДНК, которое происходит при реакции тиминового основания с активными формами кислорода, генерируемыми ионизирующей радиацией [1, 2], или как следствие аэробного метаболизма [3]. Несмотря на то что присутствие тимидингликоля вызывает мутации низкой

частоты, оно эффективно блокирует репликацию ДНК [4, 5]. Многие организмы имеют специфические репарирующие ферменты для исправления такого рода повреждений. Репарация происходит посредством выщепления основания и иницируется в клетке эндонуклеазой III [6, 7] и эндонуклеазой VIII [8].

В растворе тимидингликоля присутствуют две диастереомерные пары, находящиеся в равновесии друг с другом: 5*R*-*цис*-*транс*-пара (5*R*,6*S*), (5*R*,6*R*) или 5*S*-*цис*-*транс*-пара (5*S*,6*R*), (5*S*,6*S*), благодаря эпимеризации в C6-положении [9] (рис. 1). Известно, что в ДНК, подверженных действию гамма-излучения, 5*R*- и 5*S*-изомеры тимидингликоля образуются в равных количествах [2]. Однако окисление тимидина и его производных хими-

Сокращения: префикс “d” (дезокс) при обозначении остатков 2'-деоксирибонуклеозидов, олигодезоксирибонуклеотидов и ДНК-дуплексов опущен.

T[‡] – (5*R*,6*S*)-5,6-дигидро-5,6-дигидрокси-тимидин; TBDMS – *трет*-бутилдиметилсилил; ddR – (2*R*,2*S*)-2-гидрокси-метилтетрагидрофуран-3-ол; R.SsoII и M.SsoII – эндонуклеаза рестрикции и метилтрансфераза SsoII; Hcy(Ado) – *S*-аденозил-*L*-гомоцистеин; Met(Ado) – *S*-аденозил-*L*-метионин.

Автор для связи (тел.: (495) 939-31-48; факс: (495) 939-31-81; эл. почта: kubareva@belozersky.msu.ru).

ческими реагентами преимущественно приводит к образованию (5*R*,6*S*)-тимидингликоля [10].

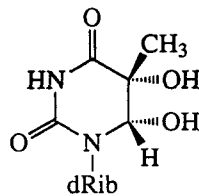
На протяжении более 30 лет все биохимические исследования, связанные с тимидингликолем, проводились с ДНК, содержащими смесь его стереоизомеров [11]. Ю. Ванг успешно использовал ВЭЖХ для выделения обоих изомеров *цис*-тимидингликоля (5*S*,6*R*) и (5*R*,6*S*) после окисления тетраоксидом осмия. В работе [8] показана способность эндонуклеазы III и эндонуклеазы VIII различать стереоизомеры тимидингликоля. Кроме того, в целом ряде биохимических исследований последних трех-четырёх лет [12–15] подчеркивается, что белки, отвечающие за определенные биологические процессы (репарацию, репликацию и др.), “различают” стереоизомеры тимидингликоля.

Существуют два основных подхода к введению такого вида модификации в ДНК. Статистическая модификация в основном предполагает обработку ДНК химическими модифицирующими агентами (перманганатом калия, тетраоксидом осмия), однако этот подход имеет определенные ограничения: большинство описанных методов не приводит к индивидуальному ДНК-продукту, а сопровождается образованием значительного количества побочных соединений [4, 10, 16]. Химический синтез олигонуклеотидов с использованием амидофосфитного реагента на основе модифицированного нуклеозида имеет безусловные преимущества перед постсинтетическими методами для получения модифицированных олигонуклеотидов прежде всего из-за отсутствия неспецифических побочных продуктов, ограничений в нуклеотидной последовательности и длине олигомеров, а также благодаря возможности крупномасштабного синтеза производных, что особенно важно для структурных исследований.

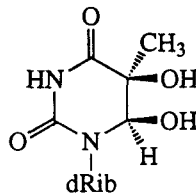
Подлинным прорывом в этой связи явились работы Ш. Иваи и др. [15, 17–19]. В 2000 г. впервые было опубликовано получение модифицированного амидофосфитного производного (5*R*,6*S*)-тимидингликоля и его включение в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического синтеза [17] (см. далее). В следующей публикации [18] представлен синтез олигонуклеотидов, содержащих (5*S*,6*R*)-изомер, и результаты изучения физико-химических свойств модифицированных дуплексов. Самые последние исследования [19] связаны с синтезом олигонуклеотидов, содержа-

5*R*-*цис*-*транс*-пара

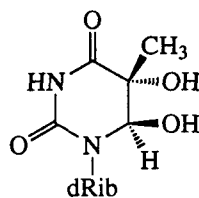
5*S*-*цис*-*транс*-пара



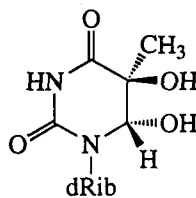
цис (5*R*,6*S*)



цис (5*S*,6*R*)



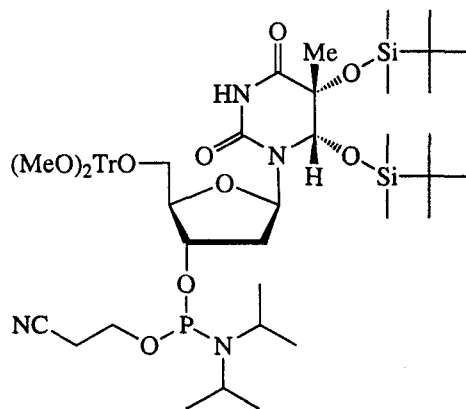
транс (5*R*,6*R*)



транс (5*S*,6*S*)

Рис. 1. Диастереомерные пары тимидингликоля.

щих 2'-фтортимидингликоля, для изучения механизма действия эндонуклеазы III.



Амидофосфитное производное тимидингликоля

В настоящей работе описан химический синтез набора модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов с одним или двумя включениями тимидингликоля. Методом УФ-спектроскопии изучена термическая устойчивость ДНК-дуплексов, содержащих остатки тимидингликоля. Впервые получены данные о взаимодействии метилтрансфераз и эндонуклеаз рестрикции типа II с ДНК-лигандами, содержащими в своем составе окисленный остаток тимина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально методом прямого включения модифицированного фрагмента в олигомер

в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза в амидофосфитном варианте были получены фрагменты ДНК, содержащие остатки тимидингликоля. Для введения модификации был использован новый модифицированный коммерческий реагент, произведенный компанией Glen Research (США) со ссылками на работы Ш. Иваи [18]. Гидроксильные функции при С5- и С6-атомах блокированы *трет*-бутилдиметилсилильными (TBDMS) защитными группами. Сертификат компании Glen Research подтверждает, что предлагаемый препарат является (5*R*,6*S*)-изомером.

Модифицированные олигонуклеотиды синтезировали автоматическим амидофосфитным методом по стандартному протоколу. Учитывая лабильность модифицированного звена, в олигонуклеотидном синтезе использовали 3'-амидофосфитные производные дезоксинуклеозидов с лабильными защитными группами гетероциклических оснований [20]. Было увеличено только время присоединения модифицированного производного до 5 мин. Получена серия модифицированных олигонуклеотидов с одним или двумя модифицированными звеньями и олигомеров с комплементарными им последовательностями. Из них были составлены дуплексы, структура которых приведена в табл. 1.

Полимерный носитель обрабатывали концентрированным аммиаком в мягких условиях (2 ч, 20°C). Далее осаждали олигонуклеотидный материал из аммиачного раствора спиртом в присут-

ствии ацетата калия. Очистка реакционных смесей методом офВЭЖХ проводилась с учетом гидрофобных свойств 5'-концевой диметокситритильной группы олигонуклеотида и двух (или четырех) TBDMS-защитных групп вицинальной диольной группировки модифицированных гетероциклических оснований. Фракции, содержащие целевые продукты, обрабатывали десилилирующим реагентом (тригидрофторидом триэтиламина, 40°C, 18 ч). При этом удаляется также (MeO)₂Tr-группа. После отщепления TBDMS-групп олигонуклеотиды подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G25. Олигонуклеотидные фракции анализировали методом офВЭЖХ в ион-парном варианте, а также методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле. Анализ показал гомогенность хроматографически выделенных соединений. Строение целевых модифицированных олигонуклеотидов было подтверждено масс-спектрометрическим анализом.

Методом УФ-спектроскопии изучена термическая устойчивость дуплексов (I)–(IX), сформированных из олигонуклеотидов, содержащих один или два остатка тимидингликоля, и комплементарных им матриц (табл. 1). Определяли зависимость поглощения раствора исследуемого образца от температуры.

Как видно из табл. 1, гипохромный эффект сопоставим для всех дуплексов и не зависит от наличия модификации. Введение остатка тимидингликоля в одну из цепей дуплекса приводит к его де-

Таблица 1. Некоторые физико-химические характеристики синтетических ДНК-дуплексов*

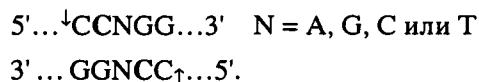
ДНК-дуплекс	Структура (5' → 3'/3' → 5')	T _{пл} , °C (±1)	h ₂₆₀ , % (±1)	C _D , 10 ⁻⁶ М
(I)	СТСАССТГСТГАСАТТТТ GAGCGGAACGACTGTAAAA	68	12	4.93
(II)	СТСАССТ [†] ТГСТГАСАТТТТ GAGCGGA-ACGACTGTAAAA	58	15	4.43
(III)	СТСАССТ [†] ТГСТГАСАТ [†] ТТТ GAGCGGA-ACGACTGTAAA	55	13	3.65
(IV)	GCTGCCAC CCTGG GTCTAAC CGACGGTG GGACC CAGATTG	75	14	4.40
(V)	GCTGCCAC CCT [†] GGTCTAAC CGACGGTG GGA-G CAGATTG	67	12	3.08
(VI)	АТСААААСАГГАСАААТТГТСТТААААССАА ТАГТТТТГТССТГТТТААСАГГАТТТГГТТ	72	13	2.55
(VII)	АТСААААСАГГА-САААТТГТСТТААААССАА ТАГТТТТГТССТ [†] ГТТТААСАГГАТТТГГТТ	60	16	2.22
(VIII)	АТСААААСАГГАСАААТТГТ [†] СТТААААССАА ТАГТТТТГТССТГТТТААСА-ГГАТТТТГГТТ	62	15	2.13
(IX)	АТСААААСАГГА-САААТТГТ [†] СТТААААССАА ТАГТТТТГТССТ [†] ГТТТААСА-ГГАТТТТГГТТ	49	18	2.05

* h₂₆₀ – гипохромия комплексобразования; C_D – концентрация ДНК-дуплекса. Выделен участок узнавания ферментами рестрикции-модификации SsoII.

стабилизации ($\Delta T_{пл}$ 8–12°C), а включение двух модификаций в одну из цепей дуплекса вызывает понижение его т. пл. еще на 3°C. Наибольший дестабилизирующий эффект ($\Delta T_{пл}$ 23°C) наблюдается в случае соединения (IX), когда модифицированные остатки находятся в разных цепях ДНК-дуплекса со сдвигом в семь нуклеотидных пар.

Анализ полученных дифференциальных кривых плавления показывает, что переход всех изученных ДНК-дуплексов в однополое состояние в целом является кооперативным процессом. Однако обращают на себя внимание уширенные дифференциальные кривые, полученные для дуплексов (III) и (IX), содержащих две модификации (рис. 2), т.е. их плавление характеризуется более низкой кооперативностью по сравнению с остальными соединениями. Смеси после плавления анализировали методом офВЭЖХ в ион-парном варианте. Полученные хроматограммы подтвердили, что деградации модифицированных нуклеотидов, входящих в состав дуплексов (II), (III), (V), (VII), (VIII) и (IX), не происходит, т.е. наблюдаемый гиперхромный эффект связан только с плавлением дуплекса.

Следующим этапом работы было изучение взаимодействия тимидингликольсодержащих ДНК с эндонуклеазой рестрикции SsoII (КФ 3.1.21.4) и метилтрансферазой SsoII (КФ 2.1.1.37). Оба фермента узнают в двуцепочечной ДНК пентануклеотидную последовательность, вырожденную по центральной нуклеотидной паре:



Эндонуклеаза рестрикции SsoII (R.SsoII) гидролизует ее в местах, указанных стрелками. В результате образуются фрагменты ДНК с фосфатной группой на 5'-конце. ДНК-метилтрансфераза SsoII (M.SsoII) метилирует внутренние остатки дезоксицитидина участка узнавания (выделены) с образованием 5-метил-2'-дезоксицитидина. Донором метильной группы является S-аденозил-L-метионин (Met(Ado)).

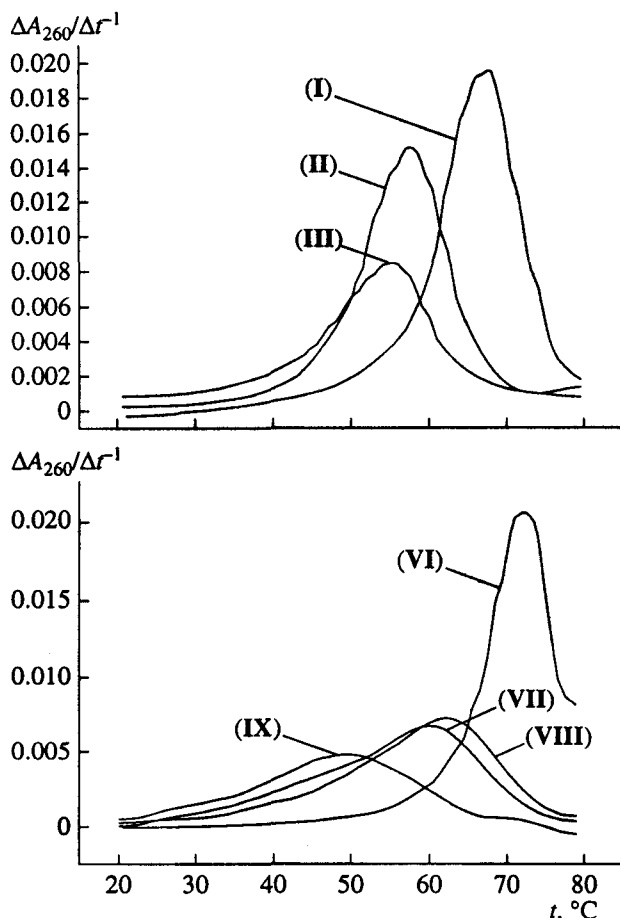


Рис. 2. Графики зависимости оптического поглощения ДНК-дуплексов от температуры в дифференциальной форме. Номера дуплексов указаны у соответствующих кривых. Условия см. "Эксперимент. часть".

Для ответа на вопрос, влияет ли окисление тиминового основания в центре вырожденного участка узнавания R.SsoII на функционирование этого фермента, мы сравнили начальные скорости гидролиза эндонуклеазой SsoII немодифицированного и модифицированного ДНК-дуплексов (IV) и (V) (табл. 2). ДНК-дуплексы (IV) и (V), содер-

Таблица 2. Взаимодействие ДНК-дуплексов с ферментами рестрикции-модификации SsoII

ДНК-дуплекс ^a	Структура (5' → 3'/3' → 5')*	K_d комплекса с M.SsoII, нМ	Отн. скорость гидролиза R.SsoII**
(IV)	GCTGCCAC CCTGG GTCTAAC CGACGGTG GGACG CAGATTG	449 ± 28	1.0 1.0
(V)	GCTGCCAC CCT ⁵ G GGTCTAAC CGACGGTG GGA-C CAGATTG	214 ± 42	3.7 1.4

* Выделен участок узнавания ферментами рестрикции-модификации SsoII.

** Данные верхней и нижней строк соответствуют расщеплению "верхней" и "нижней" цепей субстрата. Значения скорости гидролиза для ДНК-дуплекса (V) приведены относительно скорости гидролиза соответствующей цепи дуплекса (IV).

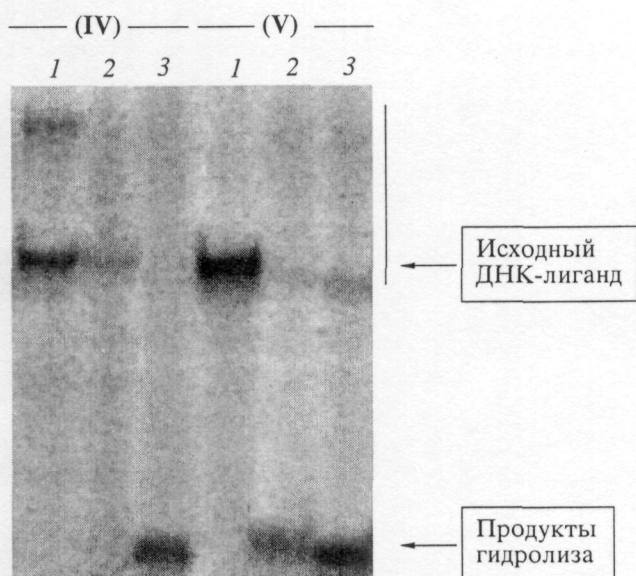


Рис. 3. Анализ продуктов гидролиза эндонуклеазы SsoII ДНК-дуплексов (IV) и (V) (^{32}P -метка в “верхней” цепи), предварительно метилированных метилтрансферазой SsoII (дорожки 2) и неметилированных (дорожки 3); 1 – исходные дуплексы.

жащие радиоактивную метку на 5'-конце “верхней” или “нижней” цепи, инкубировали при 37°C с R.SsoII определенные промежутки времени (от 1 до 20 мин). Пробы анализировали методом геле-электрофореза в ПААГ. Определяли степень гидролиза субстрата, строили кинетические кривые и рассчитывали начальные скорости гидролиза (v_0) отдельных цепей дуплексов. Введение тимидингликоля в участок узнавания необычно влияет на ход гидролиза. Начальная скорость расщепления модифицированной цепи дуплекса (V) примерно в 4 раза выше, чем аналогичной цепи субстрата (IV), а для немодифицированной цепи дуплекса (V) – в 1.5 раза выше по сравнению с этой же цепью дуплекса (IV) (табл. 2). Подобный результат наблюдался ранее при замене остатка тимидина центральной пары участка узнавания на пропиленовый “мостик”, остаток (2*R*,2*S*)-2-гидроксиметилтетрагидрофуран-3-ола (искусственный апириимидиновый “сайт”, ddR), некомплементарную ТТ-пару или гибридную $\text{rU} \cdot \text{dA}$ -пару [21–23].

Полученные нами данные подтверждают высказанное ранее предположение о том, что увеличение конформационной подвижности двуспирального участка узнавания R.SsoII в районе центральной вырожденной нуклеотидной пары приводит к повышению эффективности ферментативной реакции с участием этой эндонуклеазы [21]. Недавно был сделан рентгеноструктурный анализ комплекса эндонуклеазы рестрикции Ecl18kI с субстратом [24]. R.Ecl18kI (R.Ecl18kI) является

изошизомером и ближайшим гомологом R.SsoII. Степень идентичности аминокислотных последовательностей этих эндонуклеаз составляет 99% [25]. Было показано, что при взаимодействии R.Ecl18kI с субстратом действительно происходит значительное изменение конформации ДНК, нарушение комплементационных взаимодействий в центральной А · Т-паре участка узнавания и выведение аденозина и тимидина из состава двойной спирали [24]. Этот результат согласуется с предположенными выше результатами биохимических исследований.

Для характеристики сродства M.SsoII к участку метилирования также использовали 20-звенные синтетические субстраты (IV) и (V) (табл. 2). Комплексообразование M.SsoII с этими ДНК-лигандами изучали в присутствии $\text{poly}(\text{dI} \cdot \text{dC})$ и аналога кофактора *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина ($\text{Hcy}(\text{Ado})$). Ранее было показано, что в таких условиях наблюдается только специфическое связывание M.SsoII с ДНК-субстратами [26]. За образованием комплексов следили методом “торможения в геле”. Для комплексов M.SsoII с дуплексами (IV) и (V) были рассчитаны константы диссоциации по методу Скэтчарда [27] (табл. 2). Значения констант диссоциации комплексов M.SsoII с этими двумя ДНК-лигандами различаются примерно в 2 раза при более эффективном связывании с дуплексом (V), содержащим тимидингликоль.

Эффективность метилирования дуплексов (IV) и (V) определяли методом “обратной рестрикции”. Первоначально дуплексы инкубировали с M.SsoII, затем реакционные смеси выдерживали с эндонуклеазой SsoII. Для сравнения с R.SsoII инкубировали те же дуплексы, не модифицированные метилтрансферазой.

Из рис. 3 видно, что немодифицированный дуплекс (IV) после инкубации с M.SsoII практически не расщепляется эндонуклеазой рестрикции, что свидетельствует о высокой эффективности его метилирования, поскольку R.SsoII не способен гидролизовать участок узнавания, если хотя бы один внутренний остаток С метилирован. Инкубация дуплекса (V), содержащего тимидингликоль, с M.SsoII не “защищает” его от гидролиза ферментом рестрикции. Следовательно, окисление тимидина в последовательности (5')CCTGG препятствует метилированию участка узнавания M.SsoII, несмотря на его вырожденность по центральной нуклеотидной паре.

Данные о взаимодействии метилтрансфераз с ДНК-дуплексами, содержащими в своем составе окисленный остаток тимина, получены впервые. Однако интересно сравнить их с результатами взаимодействия M.SsoII и других метилтрансфераз (MTаз), также узнающих двутяжевую последовательность (5')CC(T/A)GG, с аналогами

субстратов, в которых удалено тиминное основание. Как было показано в работах [28, 29], замена остатка тимидина на апириимидиновый "сайт" или остаток 1,3-пропандиола в участке узнавания M.SsoII не играет существенной роли на стадии образования фермент-субстратного комплекса. В то же время каталитическая активность фермента практически блокируется. Эти результаты коррелируют с полученными нами данными. M.Ecl18kI, относящаяся к семейству SsoII-подобных метилтрансфераз, также не метилирует модифицированную цепь ДНК-дуплекса, в котором остаток тимидина заменен на остаток (2*R*,2*S*)-2-гидроксиметилтетрагидрофуран-3-ола (ddR), однако немодифицированная цепь метилируется с достаточно высокой эффективностью (80%) [30]. Степень метилирования дуплекса с остатком ddR в центральной позиции участка узнавания M.Ecl18kI в целом составляет 40% от степени метилирования немодифицированного субстрата. Аналогичная модификация участка узнавания приводит к 10-кратному ухудшению связывания M.EcoRII с ДНК-лигандом, блокированию метилирования ddR-содержащей цепи и 5-кратному ингибированию метилирования немодифицированной цепи [31]. MТаза MvaI, которая метилирует двукратную последовательность 5'-CC(T/A)GG по N4-атому внутреннего C, менее чувствительна к замене остатка тимидина на ddR. Эффективность связывания M.MvaI ухудшается только на 10%, в то время как степень метилирования модифицированной и немодифицированной цепей составляет 25 и 50% соответственно по сравнению с немодифицированным субстратом [31].

В целом, можно заключить, что для всех рассмотренных метилтрансфераз, отличающихся по степени вырожденности центральной нуклеотидной пары участка узнавания ((5')CCNCGG в случае M.SsoII и M.Ecl18kI и (5')CC(T/A)GG в случае M.EcoRII и M.MvaI) и по позиции метилирования цитозина (C5 в случае M.SsoII, M.Ecl18kI, M.EcoRII и N4 в случае M.MvaI), наличие тимидина в узнаваемой нуклеотидной последовательности и сохранение его ароматической структуры необходимо для эффективного катализа метилирования ДНК.

Таким образом, методом УФ-спектроскопии изучена термическая устойчивость ДНК-дуплексов, содержащих один или два остатка тимидингликоля. Показано, что включение даже одной модификации такого типа в состав дуплекса приводит к его существенной дестабилизации. Впервые получены данные о взаимодействии ферментов рестрикции-модификации типа II с ДНК-лигандами, содержащими в своем составе окисленный остаток тимина. Установлено, что введение тими-

дингликоля в участок узнавания эндонуклеазы рестрикции SsoII приводит к четырехкратному повышению начальной скорости гидролиза модифицированного дуплекса по сравнению с немодифицированным. В связи с этим можно полагать, что в первую очередь субстратами R.SsoII в клетке являются ДНК с модификациями (например, окисленным тимидином), нарушающими комплексообразующие взаимодействия в центральной вырожденной позиции участка узнавания фермента. В определенном смысле R.SsoII в этих случаях выступает в качестве репарирующего фермента, эффективно гидролизует поврежденную ДНК. Сродство C5-цитозиновой метилтрансферазы к ДНК-дуплексу, содержащему в центральной вырожденной позиции участка узнавания тимидингликоль, в 2 раза выше, чем к немодифицированному субстрату. Однако такая модификация ДНК-лиганда препятствует его метилированию. M.SsoII формирует прочный непродуктивный комплекс с тимидингликольсодержащим ДНК-лигандом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали тригидрофторид триэтиламина (Aldrich, США); S-аденозил-L-метионин, S-аденозил-L-гомоцистеин, poly(dI · dC), маркеры молекулярной массы белков 10–200 кДа (MBI-Fermentas, Литва); этилендиаминтетраацетат натрия, трис(гидроксиметил)аминометан (Amresco, США); хлорид магния, β-меркаптоэтанол, персульфат аммония, перхлорат лития, периодат натрия, формамид, дитиотреит (Fluka, Швейцария); N,N,N,N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, глицерин (Serva, Германия); красители-маркеры бромфеноловый синий, ксиленцианол (Reanal, Венгрия); [γ-³²P]АТФ и [α-³²P]УТФ с удельной радиоактивностью 1000 Ки/моль (ИМБ, Россия); 3'-амидофосфит тимидингликоля: 5'-O-диметокситритил-2'-дезоксидеокси-3'-O-(N,N-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-(5*R*,6*S*)-5,6-бис(*mpem*-бутилдиметилсилилокси)-5,6-дигидротимидин (Glen Research, США).

Ферменты. Рекombинантные формы ДНК-метилтрансферазы SsoII и эндонуклеазы рестрикции SsoII, содержащие 6 остатков гистидина на N-конце белковой молекулы, выделены из культуры клеток *E. coli* методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Концентрация белка в препаратах составляла 10 пмоль/мкл (M.SsoII) и 8 пмоль/мкл (R.SsoII).

Синтез модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли на автоматическом синтезаторе ABI 394 DNA/RNA по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов и растворителей. В качестве полимерного

носителя применяли стекло с определенным размером пор (LCAA-CPG-500). Удельная загрузка полимера первым мономерным звеном составляла 38–55 мкмоль/г.

3'-Амидофосфиты использовали в виде 0.1 М растворов в абсолютном ацетонитриле. Время реакции на стадии присоединения модифицированного реагента к олигомерной цепи увеличивали до 5 мин.

ВЭЖХ-анализ реакционных смесей, полученных при синтезе олигонуклеотидов, и выделение целевых продуктов, содержащих на 5'-конце диметокситритильную защитную группу и трет-бутилдиметилсилильные защитные группировки, проводили методом офВЭЖХ на хроматографе Tracor (Голландия) в подобранных нами условиях. Использовали колонку 4.6 × 250 мм с сорбентом Luna C-18(2) Phenomenex (размер частиц 5 мкм). Условия разделения: температура колонки 45°C; элюент – буфер А – 0.1 М ацетат аммония, буфер В – 40%-ный ацетонитрил в 0.1 М ацетате аммония; линейный градиент концентрации ацетонитрила 0–100% за 60 мин; расход элюента 1 мл/мин.

Удаление защитных групп после ВЭЖХ-разделения. Олигонуклеотидные фракции после очистки упаривали досуха в вакууме, затем добавляли тригидрофторид триэтиламина (100 мкл), выдерживали 16–18 ч в термостате при 40°C. Олигонуклеотиды обессоливали гель-фильтрацией на колонке с носителем G25 и анализировали методом офВЭЖХ в ион-парном варианте [32].

Спектры поглощения водных растворов олигонуклеотидов в УФ-области записывали на спектрофотометре Hitachi Model 150–20 (Япония). Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически.

Растворы ДНК-дуплексов готовили смешением эквимольных количеств соответствующих олигонуклеотидов. 5'-³²P-Меченные дуплексы получали добавлением к определенному количеству ДНК-дуплекса соответствующего ³²P-меченного олигонуклеотида. В некоторых случаях образцы нагревали до 90°C и медленно охлаждали до комнатной температуры (“отжиг”).

Зависимость устойчивости дуплекса от температуры изучали на спектрофотометре (см. выше) в 10 мМ Трис-НСl-буфере (рН 7.6) с 10 мМ MgCl₂ как описано в [33].

Масс-спектры регистрировали на приборе Bruker Reflex IV. Для олигонуклеотидов в качестве матрицы использовали смесь (1 : 1, по объему) 2,6-дигидроксиацетофенона (40 мг в 1 мл метанола) и диаммонийцитрата (80 мг в 1 мл 50% водного ацетонитрила), которую готовили непосредственно перед каждым измерением MALDI-

TOFMS. Для олигонуклеотидов (5'–3') молекулярная масса найдена/вычислена:

СТСАССТ³²TGCTGACATTTT – 5739.0/5739.7,
СТСАССТ³²TGCTGACAT³²TTT – 5773.0/5774.7,
GCTGCCACCСТ³²GGGTCTAAC – 6089.0/6088.9.

Введение ³²P-метки в олигонуклеотиды проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (10 ед. акт.) и [γ-³²P]АТФ в 10 мкл 50 мМ Трис-НСl-буфера (рН 7.6), содержащего 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 0.1 мМ спермидин и 0.1 мМ EDTA в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл 250 мМ водного раствора EDTA и прогреванием при 65°C в течение 10 мин. Далее добавляли 20 мкл 3 М водного раствора NaOAc, 68 мкл Н₂O. Фермент экстрагировали 100 мкл смеси фенол–хлороформ–изоамиловый спирт в соотношении 25 : 24 : 1. Олигонуклеотид, находящийся в водной фазе, осаждали пятикратным избытком этанола при –20°C в течение 2 ч, и смесь центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин. Радиоактивность ³²P-меченных препаратов определяли методом счета по Черенкову в импульсах в минуту на счетчике Tracor Analytic Delta 300 (ThermoQuest/CE Instruments, США). Ошибка счета не превышала 2%.

Электрофорез олигонуклеотидов в денатурирующих условиях проводили в плоском 20 × 20 × 0.1 (или 10 × 10 × 0.1) см ПААГ, содержащем 19% акриламида, 1% N,N'-метиленбисакриламида и 7 М мочевины. Электродный буфер – 50 мМ Трис-борат (рН 8.3), 1 мМ EDTA. Напряженность поля 50 В/см. Пробы наносили на гель в 10–15 мкл раствора для анализа олигонуклеотидов: 0.025% раствор бромфенолового синего и ксиленицианола в смеси формамид–вода = 80 : 20.

Визуализацию радиоактивных полос в геле и обсчет данных проводили на приборе Molecular Dynamics PhosphorImager SI (Molecular Dynamics, США), используя компьютерную программу Image Quantum, версия 5.0. Положение олигонуклеотидных фрагментов определяли также методом радиоавтографии.

Определение начальной скорости гидролиза ДНК-субстрата эндонуклеазой рестрикции SsoII. ДНК-дуплексы (IV) и (V) (концентрация 350 нМ), содержащие ³²P-метку в одной из цепей, инкубировали с R.SsoII (концентрация 66 нМ в расчете на мономер) в 80 мкл 50 мМ Трис-НСl-буфера (рН 7.6), содержащего 50 мМ NaCl, 5 мМ дитиотреит, 1 мМ MgCl₂ при 37°C. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты. Время инкубации варьировали от 1.5 до 20 мин. Реакцию останавливали прогреванием инкубационной смеси при 95°C в течение 5 мин. Продукты гидролиза анализировали методом гель-электрофореза в 20% ПААГ, содержащем

7 М мочевины. Степень гидролиза дуплексов (IV) и (V) R.SsoII определяли отдельно для каждой цепи как отношение радиоактивности продукта к суммарной радиоактивности продукта и нерасщепленного субстрата, умноженное на 100%. Метка вводилась в одну из цепей дуплекса. Начальные скорости гидролиза (v_0) ДНК-дуплексов определяли графически как угловой коэффициент (тангенс угла наклона) начального прямолинейного участка кинетической кривой. Расчет проводили для восьми значений времени реакции. Относительные v_0 определяли как отношение начальных скоростей гидролиза отдельных цепей модифицированного ДНК-дуплекса к v_0 соответствующей цепи базового субстрата. Измерения проводили не менее трех раз, в дальнейших расчетах использовали среднее значение. Воспроизводимость результатов измерений характеризует средняя относительная погрешность, не превышающая 20%.

Комплексообразование M.SsoII с ДНК-дуплексами, содержащими ^{32}P -метку в одной из цепей, проводили в 20 мкл 50 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.6), содержащего 150 мМ NaCl, 5 мМ дитиотреит, 50 нг/мкл poly(dI · dC) и 0.5 мМ Hcy(Ado), в течение 20 мин при 37°C. Белково-нуклеиновый комплекс и свободный ДНК-дуплекс разделяли методом гель-электрофореза в плоском 20 × 18 × 0.15 см ПААГ, содержащем 6.8% акриламида, 0.2% N,N'-бисакриламида, в электродном буфере (50 мМ Трис-борат (рН 8.3), 1 мМ EDTA) при напряженности поля 8.5 В/см. Пробы наносили на гель в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10–20%-ный глицерин. Степень связывания M.SsoII с ДНК-дуплексом определяли как отношение радиоактивности зоны, соответствующей ДНК-белковому комплексу, к сумме радиоактивности зон, соответствующих ДНК-белковому комплексу и несвязавшейся ДНК. Константы диссоциации M.SsoII с ДНК-дуплексами определяли методом Скэтчарда [27]. Концентрации ДНК-дуплексов (IV) и (V) изменяли в интервале от 20 до 100 нМ. Концентрации M.SsoII составляли 50 нМ при комплексообразовании с дуплексом (IV) и 8 мкМ при комплексообразовании с дуплексом (V).

Определение эффективности метилирования ДНК-субстратов (IV) и (V) метилтрансферазой SsoII оценивали по степени “защиты” ими субстрата от гидролиза эндонуклеазой SsoII. ^{32}P -Меченный ДНК-дуплекс (концентрация 350 нМ) инкубировали с M.SsoII (10 нМ) в 50 мМ Трис-НСI-буфере (рН 7.6), содержащем 150 мМ NaCl, 5 мМ дитиотреит и 0.1 мМ Met(Ado) в течение 0.5–60 мин при 37°C. Затем реакционную смесь выдерживали 10 мин при 65°C для инактивации M.SsoII, после охлаждения до 25°C добавляли MgCl₂ (концентрация в реакционной смеси 1 мМ) и эндонуклеазу

SsoII (концентрация 240 нМ) и инкубировали 1 ч при 37°C. Продукты гидролиза анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 06-04-49196, 06-04-49667, 07-04-00545) и гранта программы NATO “Science for Peace” № 978003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frenkel K., Goldstein M.S., Teebor G.W. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 7566–7571.
2. Teebor G., Cummings A., Frenkel K., Shaw A., Voituriez L., Cadet J. // *Free Radic Res. Commun.* 1987. V. 2. P. 303–309.
3. Adelman R., Saul R.L., Ames B.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 2706–2708.
4. Ide H., Kow Y.W., Wallace S.S. // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. P. 8035–8052.
5. Clark J.M., Beardsley G.P. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. P. 737–749.
6. Kow Y.W., Wallace S.S. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 8200–8206.
7. Bailly V., Verly W.G. // *Biochem. J.* 1987. V. 242. P. 565–572.
8. Miller H., Fernandes A.S., Zaika E., McTigue M.M., Torres M.C., Wente M., Iden C.R., Grollman A.P. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 338–345.
9. Lustig M.J., Cadet J., Boorstein R.J., Teebor G.W. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 4839–4845.
10. Kao J.Y., Goljer I., Phan T.A., Bolton P.H. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 17787–17793.
11. Wang Y. // *Chem. Res. Toxicol.* 2002. V. 15. P. 671–676.
12. Fischhaber P.L., Gerlach V.L., Feaver W.J., Hatahet Z., Wallace S.S., Friedberg E.C. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 37604–37611.
13. Katafuchi A., Nakano T., Masaoka A., Terato H., Iwai S., Hanaoka F., Ide H. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 14464–14471.
14. McTigue M.M., Rieger R.A., Rosenquist T.A., Iden C.R., De Los Santos C.R. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. P. 313–322.
15. Shimizu T., Manabe K., Yoshikawa S., Kawasaki Y., Iwai S. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 313–321.
16. Clark J.M., Beardsley G.P. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 5398–5403.
17. Iwai S. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000. V. 39. P. 3874–3876.
18. Iwai S. // *Chem. Eur. J.* 2001. V. 7. P. 4343–4351.
19. Doi Y., Katafuchi A., Fujiwara Y., Hitomi K., Tainer J.A., Ide H., Iwai S. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 1540–1551.
20. The Glen Report. 2003. V. 16. P. 4.
21. Kubareva E.A., Petrauskene O.V., Karyagina A.S., Tashlitsky V.N., Nikolskaya I.I., Gromova E.S. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 4533–4538.
22. Громова Е.С., Кубарева Е.А., Елов А.А., Акатова Е.А., Никольская И.И., Шабарова З.А. // *Биохимия*. 1991. Т. 56. С. 552–559.

23. Виноградова М.Н., Громова Е.С., Упорова Т.М., Никольская И.И., Шабарова З.А., Дебов С.С. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. С. 732–736.
24. Bochtler M., Szczepanowski R.H., Tamulaitis G., Grazulis S., Czaplinska H., Manakova E., Siksnys V. // EMBO J. 2006. V. 25. P. 2219–2229.
25. Деньмухаметов М.М., Захарова М.В., Кравец А.Н., Перцев А.В., Синева Е.В., Реник А.В., Белецкая И.В., Громова Е.С., Солонин А.С. // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. С. 831–838.
26. Воробьева О.В. С5-Цитозиновая ДНК-метилтрансфераза SsoII как бифункциональный белок: изучение взаимодействия с участком метилирования и с промоторной областью генов системы рестрикции-модификации SsoII. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 2004. С. 67–70.
27. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. С. 370–404.
28. Brevnov M.G., Kubareva E.A., Romanova E.A., Volkov E.M., Karyagina A.S., Nikolskaya I.I., Gromova E.S. // Gene. 1995. V. 157. P. 149–152.
29. Vorob'eva O.V., Karyagina A.S., Volkov E.M., Viryasov M.B., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2002. V. 28. P. 363–370 (Воробьева О.В., Карягина А.С., Волков Е.М., Вирясов М.Б., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // Биоорган. химия. 2002. Т. 28. С. 402–410).
30. Denjmukhametov M.M., Brevnov M.G., Zakharova M.V., Repyk A.V., Solonin A.S., Petrauskene O.V., Gromova E.S. // FEBS Lett. 1998. V. 433. P. 233–236.
31. Бревнов М.Г. Метилтрансферазы EcoRII и MvaI: особенности механизмов взаимодействия с ДНК, аффинная модификация. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1996. С. 107.
32. Ташлицкий В.Н., Орецкая Т.С. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 684–693.
33. Тимченко М.А., Первушина Е.В., Ташлицкий В.Н., Кубарева Е.А., Крынецкая Н.Ф. // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. С. 101–109.

Synthesis and Characteristics of Modified DNA Fragments Containing Thymidine Glycol Residues

E. A. Fedotova^a, F. Yang^a, E. A. Kubareva^{b,*}, E. A. Romanova^b, A. S. Protsenko^c, M. B. Viryasov^a, T. Hianik^d, and T. S. Oretskaya^a

* Phone: +7 (495) 939-3148; fax: +7 (495) 939-3181; e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

^a Department of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

^b Belozerskii Institute of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

^c Pushchino State University, Skryabin Institute of the Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

^d Faculty of Mathematics, Physics, and Computer Science, Comenius University, Bratislava, 84248 Slovakia

Chemical synthesis of a series of modified oligodeoxyribonucleotides containing one or two residues of thymidine glycol (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymidine), the main product of oxidative DNA damage, is described. The thermal stability of DNA duplexes containing thymidine glycol residues was studied using UV spectroscopy. Introduction of even one thymidine glycol residue into the duplex structure was shown to result in its significant destabilization. Data on the interaction of DNA methyltransferases and type II restriction endonucleases with DNA ligands containing oxidized thymine were obtained for the first time. Introduction of a thymidine glycol residue into the central degenerate position of the recognition site of restriction endonuclease SsoII was found to result in an increase in the initial hydrolysis rate of the modified duplex in comparison with that of the unmodified structure. The affinity of 5-cytosine methyltransferase SsoII for the DNA duplex bearing thymidine glycol was found to be twofold higher than for the unmodified substrate. However, such a modification of the DNA ligand prevents its methylation.

Key words: DNA methyltransferase SsoII, modified oligonucleotides, restriction endonuclease SsoII, thymidine glycol