



УДК 577.113.4

ВВЕДЕНИЕ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ ТРИ- И ТЕТРАФОСФАТНЫХ СВЯЗЕЙ В ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДЫ

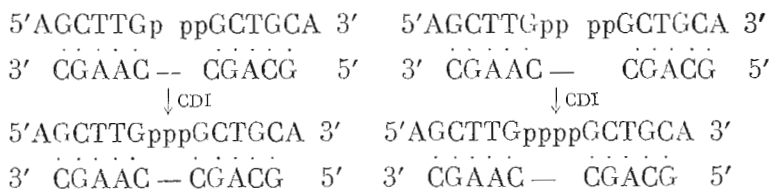
Пурмаль А. А., Друца В. Л., Ишбарова З. А.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет и межфакультетская проблемная
научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Методом химической конденсации на матрице под действием водорастворимого карбодиимида получены додекадезоксирибонуклеотиды, d(AGCTTGpppGCTGCA) и d(AGCTTGppppGCTGCA) с три- и тетрафосфатными межнуклеотидными связями.

Интенсивное развитие химических методов синтеза фрагментов нуклеиновых кислот сделало доступными для исследователей не только олигонуклеотиды природного строения, но и целый ряд их неприродных аналогов, в том числе с измененной структурой межнуклеотидных связей. Ранее нами был предложен способ модификации ДНК введением в состав синтетических олиго- и полинуклеотидов межнуклеотидных дифосфатных связей [1, 2]. Исследование таких соединений показало, что наличие в них наряду с природными небольшим количеством ($\leq 10\%$) дифосфатных межнуклеотидных связей практически не нарушает их комплементарных свойств [3]. В то же время необычные химические свойства позволили с успехом использовать такие соединения в качестве аналогов субстратов при исследовании деталей механизмов действия целого ряда эндонуклеаз рестрикции [2, 4–9]. Для продолжения этих исследований в настоящей работе с использованием метода «химического лигирования» [10] впервые получены додекануклеотиды AGCTTGpppGCTGCA (I) и AGCTTGppppGCTGCA (II), центральная фосфодиэфирная межнуклеотидная связь в которых заменена соответственно три- и тетрафосфатной группировкой.

Додекануклеотид (I) синтезирован конденсацией под действием водорастворимого карбодиимида (CDI) 3'-фосфорилированного гексануклеотида AGCTTGp (III) и 5'-дифосфата гексануклеотида — ppGCTGCA (IV). Аналогично додекануклеотид (II) получен соединением соответственно 3'- и 5'-концевых β -фосфатных остатков дифосфатов гексануклеотидов AGCTTGpp (V) и (IV). Обе реакции проводили в условиях существования комплементарного комплекса конденсируемых олигонуклеотидов с матричным декануклеотидом GCAGCCAAGC (VI):



При проведении конденсаций на матрице исходные олигонуклеотиды растворяли в MES-буфере (50 мМ, рН 6,1) так, чтобы их суммарная концентрация (в расчете на мономерное звено) составляла 1,5 мМ, а мольные соотношения олигонуклеотидов (III) : (IV) : (VI) или (V) : (IV) : (VI) были равны 1 : 1 : 1,5. Для облегчения количественной оценки результа-

Префикс «d» для обозначения дезоксирибонуклеотидов везде для краткости опущен; CDI — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, MES — 4-морфолиноэтансульфоновая кислота, p — [32 P]фосфат.

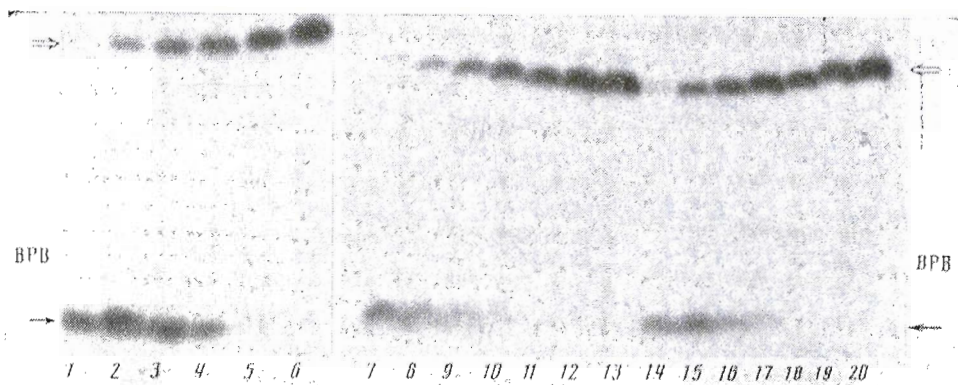


Рис. 1. Радиоавтографы электрофоретического разделения в 20% ПААГ продуктов CDI-индуцируемых конденсаций на матрице GCAGCCAAGC гексануклеотидов AGCTTGpp (III) + ppGCTGCA (IV*) (1-6), AGCTTGpp (V) + ppGCTGCA (IV*) (7-13) и AGCTTGpp (V*) + ppGCTGCA (IV) (14-20) через 0,1 (1, 7 и 14), 0,5 (2, 8 и 15), 1 (3, 9 и 16), 2 (4, 10 и 17), 6 (5, 11 и 18), 24 (6, 12 и 19) и 48 ч (13 и 20) после добавления CDI. Одинарными стрелками сбоку обозначена электрофоретическая подвижность гексануклеотидов, двойными — додекануклеотидов. ВРВ — положение красителя-маркера бромфенолового синего

тов химических матричных конденсаций, а также для подтверждения структуры центральных межнуклеотидных узлов в синтезированных додекануклеотидах (I) и (II) к реакционным смесям добавляли индикаторные количества дифосфатных производных гексануклеотидов, меченных радиоизотопом ^{32}P в β -положении дифосфатных групп. В первом случае использовали ppGCTGCA (IV*), во втором — как (IV*), так и AGCTTGpp (V*). Все исходные реакционные смеси перед добавлением карбодиимида подвергали отжигу от 60 до 0° С в течение 4 ч. Матричную конденсацию проводили в условиях, описанных ранее [10]. В кинетических экспериментах через определенные промежутки времени отбирали аликвоты реакционных смесей, олигонуклеотиды осаждали четырьмя объемами ацетона, содержащего 2% перхлората лития, и анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (рис. 1).

Во всех исследованных реакциях конденсации на матрице образовывался и быстро накапливался единственный ^{32}P -меченый продукт с электрофоретической подвижностью, приблизительно соответствовавшей подвижности додекануклеотида. Выщепления [^{32}P]фосфата ни в одном случае не происходило. Реакции практически заканчивались за 6 ч, выход продуктов конденсации превышал 90%. В контрольных экспериментах в отсутствие матричного додекануклеотида (VI) конденсация практически не происходила. Обнаружено также, что при синтезе додекануклеотида (II) с использованием в качестве радиоактивных дифосфатных гексануклеотидов AGCTTGpp (рис. 1, 7-13) и ppGCTGCA (рис. 1, 14-20) приблизительно с равными скоростями образовывался один и тот же (по электрофоретической подвижности) меченый продукт.

Приведенные экспериментальные данные позволяют достаточно надежно установить структуру синтезированных в настоящей работе соединений (I) и (II). В самом деле, известно, что при обработке КДИ водных растворов монозамещенных моно-, ди- или трифосфатов (AMP, ADP или ATP) единственными конечными продуктами их конденсации являются симметричные дизамещенные полифосфаты и не наблюдается образования соединений с трехзамещенным фосфатом [11]. Таким образом, появление в додекануклеотидах (I) и (II) ^{32}P -метки, бывшей исходно в β -положении дифосфатов гексануклеотидов, при полном отсутствии процессов образования других меченых олигонуклеотидов и (или) выщепления свободного [^{32}P]фосфата может быть достаточно надежным свидетельством образования 3'-5'-межнуклеотидных соответственно три- и тетраполифосфатных группировок. Последовательность нуклеотидов в соединениях

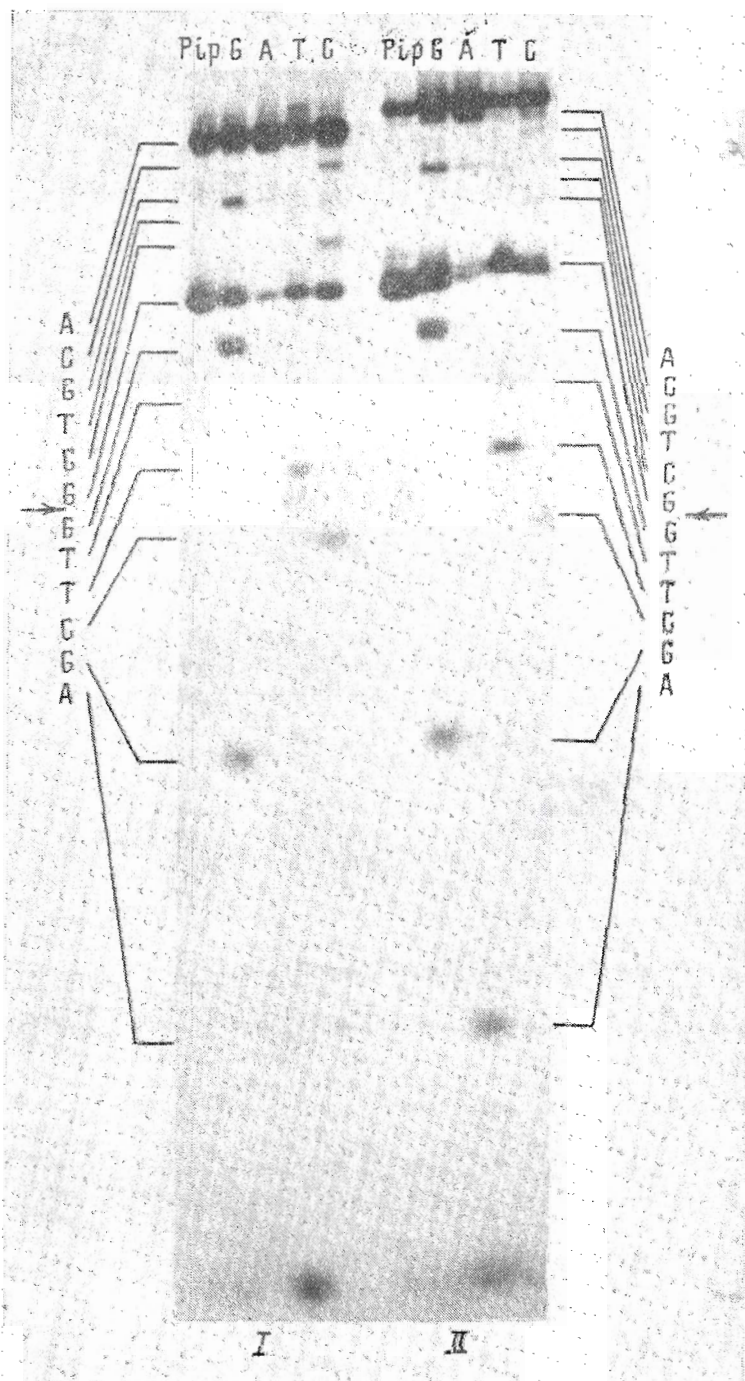


Рис. 2. Радиоавтографы секвенирующих 20% ПААГ при анализе методом Максама — Гилберта (твердофазным) [12] структуры додекануклеотидов AGCTTGrpprGCTGCA (I) и AGCTTGrpprrGCTGCA (II). Сверху указаны реакции модификации: P — 1 М водным пиперидином, 90° С, 30 мин; G — диметилсульфатом, А — диэтилпирокарбонатом, Т — перманганатом калия, С — гидроксиламиноном с последующей обработкой 1 М пиперидином. Стрелками показано положение, соответствующее межнуклеотидным три- или тетрафосфатным группировкам

(I) и (II) определяется первичной структурой исходных гексануклеотидов и матричным способом их конденсации. Структура полученных додекануклеотидов (I) и (II) была экспериментально подтверждена методом Максама — Гилберта после введения в них 5'-концевой ^{32}P -метки с по-

мощью Т4-полинуклеотидкиназы и [γ - 32 P]АТР [12] с высокой удельной радиоактивностью. На радиоавтографе геля (рис. 2) видно, что во всех колонках присутствует интенсивная полоса, соответствующая расщеплению межнуклеотидной связи между шестым и седьмым нуклеотидными звеньями продуктов конденсации. Наличие подобного расщепления — результат гидролиза в условиях секвенирования (реакция модификации + пиперидиновая обработка) полифосфатных межнуклеотидных узлов в додекануклеотидах (I) и (II). Таким образом, эти данные подтвердили не только первичную структуру синтезированных додекануклеотидов (I) и (II), но также наличие и положение в них полифосфатных межнуклеотидных узлов.

Исследование химических свойств додекануклеотидов (I) и (II) с три- и тетрафосфатными межнуклеотидными связями показало, что они вполне устойчивы в нейтральных и слабокислых средах, но относительно медленно гидролизуются в щелочных растворах. Так, например, они без заметной деградации переносят 30-минутную обработку 80% уксусной кислотой при комнатной температуре, но выдерживание их то же время в 1 М водном пиперидине при 90°С приводит к расщеплению на 50–55% додекануклеотида (I) и на 75–80% додекануклеотида (II). Отметим также несколько меньшую электрофоретическую подвижность в 20% полиакриламидном геле додекануклеотида (II) по сравнению с додекануклеотидом (I), который в свою очередь имеет пониженную подвижность в сравнении с немодифицированным додекануклеотидом рАГСТТGGCTGCA.

Авторы выражают благодарность В. Н. Сергееву (МГУ) за помощь в секвенировании использованных в работе олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использованы Т4-полинуклеотидкиназа (НПО «Фермент», Вильнюс), [γ - 32 P]АТР и [32 P]ортофосфат с удельной радиоактивностью $4 \cdot 10^{19}$ Бк/моль («Изотоп», СССР), 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодимид и 4-морфолинэтансульфоновая кислота (Merck, ФРГ), акриламид и N,N'-метилеи-бисакриламид (Serva, ФРГ).

Исходные олигонуклеотиды синтезированы твердофазным фосфамидитным методом [13] с последующей очисткой методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Гексануклеотид рGCTGCA синтезировали из гептануклеотида rU(5'-5')GCTGCA периодатным окислением с последующим β -элиминированием, а гексануклеотид (II) — с 3'-фосфатным остатком из гептануклеотида АГСТТGrU [14]. Дифосфаты гексануклеотидов (IV) и (V) синтезированы имидазольным методом [1] в среде диметилформамид — вода (9:1) с выходом 50–60% из 3'- или 5'-фосфорилированных гексануклеотидов и ортофосфата, содержавшего, если требовалось, индикаторные (~1 МБк) количества 32 P-метки.

Матричные конденсации олигонуклеотидов проводили при 0°С по методике, подробно описанной в работе [10].

Первичную структуру олигонуклеотидов определяли методом Максама — Гилберта в его твердофазном варианте [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Ивановская М. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 265. № 1. С. 242–245.
2. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 394–400.
3. Долинная Н. Г., Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А. // Вестн. МГУ. 1986. Сер. 2, химия. Т. 27. № 5. С. 520–524.
4. Пурмаль А. А., Виноградова М. Н., Елов А. А., Громова Е. С., Друца В. Л., Метелев В. Г., Холодков О. А., Бурьянов Я. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276. № 4. С. 992–995.
5. Виноградова М. Н., Громова Е. С., Пурмаль А. А., Косых В. Г., Шабарова З. А. // Молекулярн. биология. 1986. Т. 20. № 5. С. 1326–1336.
6. Yolov A. A., Gromova E. S., Kubareva E. A., Potapov V. K., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8969–8981.
7. Громова Е. С., Елов А. А., Кубарева Е. А., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Молекулярн. биология. 1986. Т. 20. № 1. С. 29–40.
8. Громова Е. С., Кубарева Е. А., Пайн К.-Д., Орещкая Т. С., Шабарова З. А., Цех Д., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 6. С. 1493–1497.
9. Pein C. D., Cech D., Kubareva E. A., Gromova E. S., Oretskaya T. S., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. Symp. Series. 1987. № 18. Title № 56. P. 225–228.
10. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutsa V. L., Melnikova N. P., Purmal A. A. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747–5761.
11. Ng K. E., Orgel L. E. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 8. P. 3573–3580.

12. Rosenthal A., Schwertner S., Hahn V., Hunger H.-D. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 4. P. 1173-1184.
13. Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments/Eds Gassen H. G., Lang H. Basel: Verlag chemie, 1982. P. 71-79.
14. Орещкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Романова Е. А. // Химия природ. соединений. 1987. № 5. С. 731-734.

Поступила в редакцию
28.XII.1987

INTRODUCTION OF TRI- AND TETRAPHOSPHATE INTERNUCLEOTIDE BONDS IN OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

PURMAL A. A., DRUTSA V. L., SHABAROVA Z. A.

*Department of Chemistry and A. N. Belozersky Laboratory
of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov
Moscow State University*

Dodecadeoxyribonucleotides d(AGCTTGpppGCTGCA) and d(AGCTTGppppGCTGCA) were obtained by template directed chemical condensation induced by a water-soluble carbodiimide.