



УДК 577.113.4

© 1991 г.

С. А. Кузнецова, М. Г. Ивановская, З. А. Шабарова

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

XIII.* НАПРАВЛЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ АЦИЛФОСФАТНОЙ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ В СТРУКТУРУ ДНК-ДУПЛЕКСОВ

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

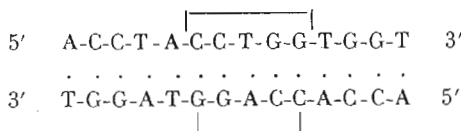
Осуществлен синтез ДНК-дуплекса, содержащего в одной из цепей в заданном положении сахарофосфатного остова ацилфосфатную межнуклеотидную связь. Синтез проводили путем конденсации на комплементарной матрице двух гептануклеотидов, один из которых содержал на 3'-конце остаток глицина, связанный с олигонуклеотидом фосфоамидной связью, а 5'-концевая фосфатная группа другого была активирована. Активацию проводили с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида. Выход олигонуклеотида с ацилфосфатной межнуклеотидной связью составил 24%. Изучены устойчивость и химические свойства синтезированного соединения в сравнении с аналогичным олигонуклеотидом, содержащим замещенную пиррофосфатную межнуклеотидную связь. Показано, что олигонуклеотид с ацилфосфатной связью — эффективный ацилирующий агент в водной среде в отличие от олигонуклеотида с замещенной пиррофосфатной связью, являющегося фосфорилирующим агентом.

Фрагменты нуклеиновых кислот с модифицированным сахарофосфатным остовом широко используются для изучения субстратной специфичности и механизма действия клеточных ферментов [2], в структурно-функциональных исследованиях белков и нуклеиновых кислот [3], в качестве реагентов направленного мутагенеза [4]. В последние годы в связи с выявлением таких свойств модифицированных фрагментов нуклеиновых кислот, как способность направленным образом воздействовать на экспрессию и реконструкцию генетического материала [5, 6], интерес к такому рода соединениям резко возрос. Особое внимание при этом уделялось получению негидролизующихся аналогов нуклеиновых кислот, а также синтезу соединений с различными новыми структурами межнуклеотидных связей [7, 8].

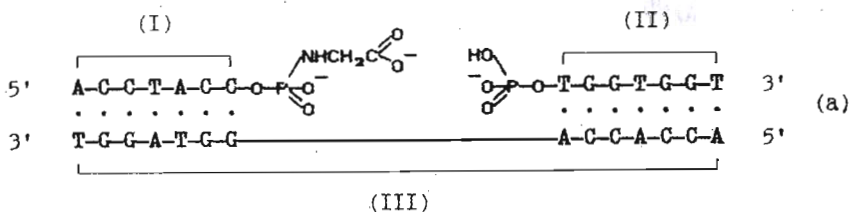
Цель настоящей работы — получение нового типа синтетических ДНК-дуплексов, содержащих в заданном положении сахарофосфатного остова легко расщепляемую ацилфосфатную межнуклеотидную связь вместо природной фосфодиэфирной. Интерес к дуплексам подобной структуры обусловлен тем, что ацилфосфаты моделируют переходное состояние при работе ряда ферментов [9]. Кроме того, ацилфосфатная связь, химически активная в соединениях более простой структуры [10], может проявлять аналогичные свойства и в составе ДНК-дуплекса. Изучение свойств этой связи в структуре синтетических дуплексов открывает новые возможности их использования в реакциях, протекающих в биоспецифических комплексах белков и нуклеиновых кислот. Так, введение расщепляемой связи в участок узнавания ферментов рестрикции/модификации открывает уникальную возможность аффинной модификации этого малоизученного класса ферментов.

* Сообщение XII см. [1]. Сокращения: EDAC — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; MES — 2-морфолиноэтансульфокислота; ^{*}p — ³²P. Символ d (дезокс-) в обозначении олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

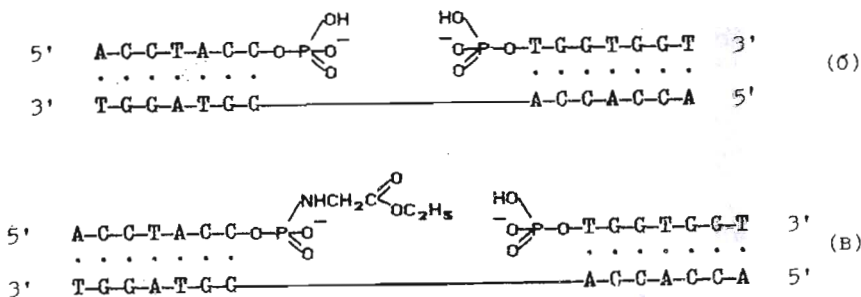
Объектом исследования в данной работе служил синтетический ДНК-дуплекс, содержащий участок узнавания эндонуклеазы *EcoRII* и ее изоизомеров *SsoII* и *MvaI* ($CC^T/_{\Delta}GG$):



Для введения ацилфосфатной межнуклеотидной связи в структуру участка узнавания указанных ферментов использовали предложенный нами ранее [11] принцип химической конденсации модифицированных по 5'- и 3'-концу олигонуклеотидных блоков в условиях существования их комплекса с комплементарной матрицей:



Этот же подход был использован нами ранее для введения пиррофосфатной [12, 13] и замещенной пиррофосфатной связей [13] в дуплекс той же первичной структуры, поэтому изучение конденсации в комплексе (а) мы проводили в сравнении с комплексами (б) и (в) — исходными структурами при синтезе дуплексов с пиррофосфатной и замещенной пиррофосфатной связями, отличающимися от комплекса (а) только структурой ула синтеза связи:



Синтез исходных олигонуклеотидов TGGTGGT и (III) выполнен фосфотриэфирным методом и описан в работе [14]; олигонуклеотид (II) получали 5'-фосфорилированием гептануклеотида TGGTGGT с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Модифицированный гептануклеотид (I) синтезировали путем прямой конденсации гептануклеотида ACCTACCp с этиловым эфиром глицина под действием EDAC с последующим омылением сложноэфирной связи [15]. Гептануклеотид ACCTACCp был получен в результате периодатного окисления октануклеотида ACCTACCpU [16], синтезированного также фосфотриэфирным методом.

В дуплексе (а) 3'-карбоксильная группа модифицированного гептануклеотида (I) и 5'-фосфатная группа гептануклеотида (II) находятся в непосредственной близости. Ранее было показано, что в водной среде под действием водорастворимых конденсирующих агентов в ДНК-дуплексах подобного типа возможно образование межнуклеотидной, в том числе и модифицированной, связи [17]. При этом во всех изученных ра-

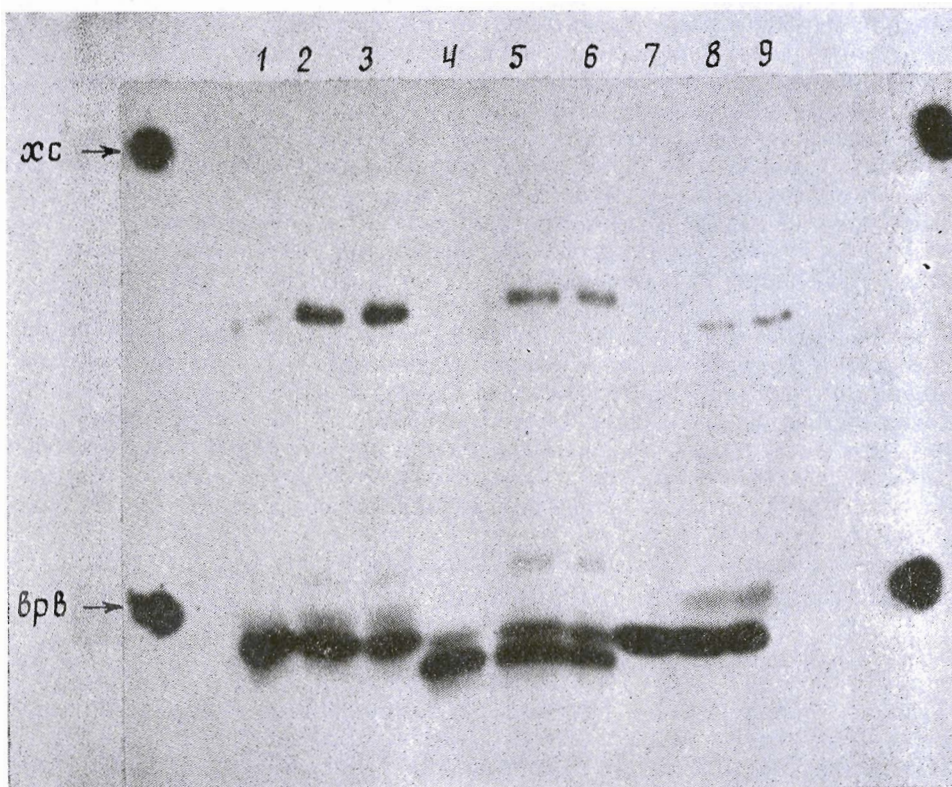


Рис. 1. Электрофорез реакционных смесей, образующихся в результате карбодимидной конденсации в комплексах (а) (4–6), (б) (7–9). Три дорожки в каждом случае соответствуют реакционным смесям, образующимся за 2, 5 и 20 ч. Конденсацию $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -меченых модифицированных гептануклеотидов ($C_0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) проводили при 0° C и концентрации EDAC 0,1 M. врв и хс — маркеры-красители бромфеноловый синий и ксиленцианол

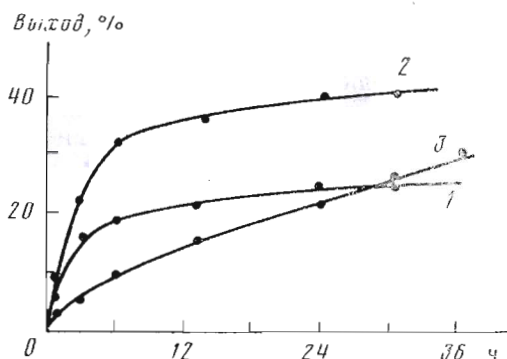


Рис. 2. Кривые накопления продуктов химического лигирования в комплексах (а) (1), (б) (2), (в) (3). Условия см. в подписи к рис. 1

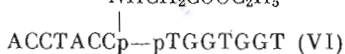
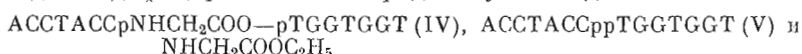
нее случаях происходила активация только фосфатной группы олигонуклеотида. В данном исследовании мы впервые смоделировали структуру, когда в узле синтеза модифицированной межнуклеотидной связи оказались сближенными две группировки различной природы, каждая из которых способна активироваться под действием конденсирующего агента.

В качестве конденсирующего агента использовали EDAC, как наиболее распространенный реагент при проведении химического лигирования. Известно, что скорость реакции карбодимидов с кислотами зависит при прочих равных условиях от нуклеофильности анионов применяемых кислот [18]. Поэтому, очевидно, с большей скоростью должна происходить

активация карбоксильной группы гептануклеотида (I), что и будет в результате определять направление реакции, так как скорость химического лигирования под действием EDAC определяется скоростью образования аддукта карбодиимида с активируемой им группой [19]. В этом случае роль нуклеофила может играть 5'-фосфатная группа гептануклеотида (II), что приведет к образованию межмолекулярной ацилфосфатной связи между гептануклеотидами (I) и (II).

Контроль за ходом реакции осуществляли электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях, используя ^{32}P -меченные олигонуклеотиды. Как видно из рис. 1, 2, накопление продуктов конденсации происходит во всех трех комплексах (а) — (в), причем в комплексе (а) с большей скоростью, чем в комплексе (в). Это подтверждает наше предположение о преимущественном образовании аддукта EDAC с карбоксильной группой гептануклеотида (I), поскольку в том случае, где заведомо происходит активация фосфатной группы (комплекс (в)), образование аддукта идет медленнее. Образование в результате конденсации в комплексе (а) единственного продукта реакции говорит о том, что возможная параллельная реакция образования замещенной пирофосфатной связи в данном случае не идет.

Выходы модифицированных тетрадекануклеотидов



при концентрации EDAC 0,1 М за 1 сут протекания реакции в комплексах (а) — (в) составили 24, 40 и 19% соответственно.

Поскольку соединение (IV) было получено впервые, представляло интерес изучить свойства модифицированной межнуклеотидной связи и сравнить их со свойствами уже изученных соединений (V) и (VI), образующихся при проведении конденсаций в комплексах (б) и (в). Исследования показали, что в водной среде (рН 6,0) и 37° С в отсутствие нуклеофильных агентов тетрадекануклеотид (IV) устойчив, по крайней мере в течение нескольких суток, в отличие от ацилфосфата нуклеотидной природы, гидролизующегося почти мгновенно в водной среде.

Представлялось важным исследовать реакционную способность и сравнительную гидролитическую устойчивость олигонуклеотидов с различными модификациями в отношении к нуклеофильным агентам в водной среде. Известно, что пирофосфатная связь устойчива при обработке нуклеофильными агентами в водной среде [12]. Недавно мы показали, что атака нуклеофильного агента в водной среде при наличии замещенной пирофосфатной связи происходит по дизамещенной фосфатной группе и, таким образом, олигонуклеотиды, содержащие замещенную пирофосфатную связь, являются фосфорилирующими агентами [13]. Известно также, что чаще всего реакции ацилфосфатов с нуклеофильными агентами приводят к переносу ацильного остатка на нуклеофил [10], т. е. образуется соответствующее производное карбоновой кислоты. Направление реакции в этом случае, по-видимому, определяется большей электрофильностью атома углерода и его доступностью вследствие плоского строения карбоксильной группы. Для сравнения протекания реакций нуклеофильного замещения в модифицированных тетрадекануклеотидах, образующихся в результате карбодиимидной конденсации в дуплексах (а) и (в), мы обработали эти соединения 0,5 М водным раствором этилендиамина (рН 8,0). При этом использовали тетрадекануклеотиды, несущие ^{32}P -метку в середине олигонуклеотидной цепи, т. е.



Как следует из полученных нами ранее данных [13], а также из данных рис. 3, при реакции соединения (VI) с этилендиамином происходит фосфорилирование последнего, т. е. остаток гептануклеотида $p\text{TGGTGGT}^*$

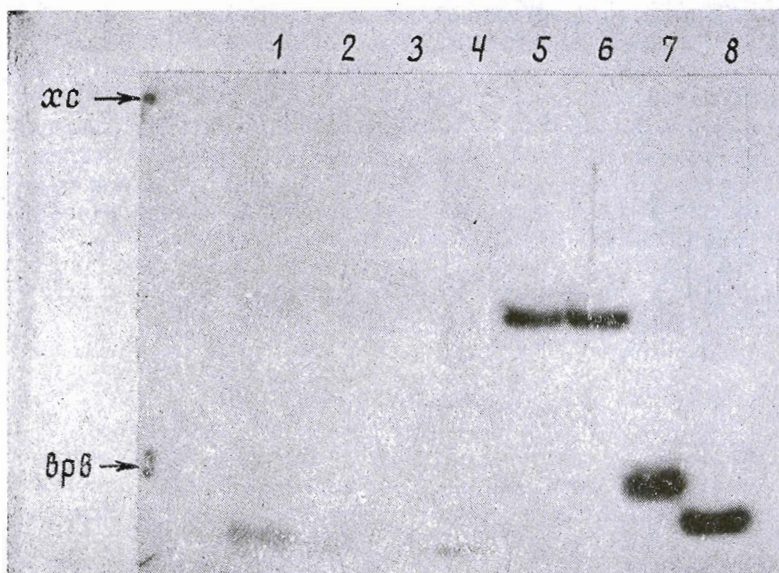


Рис. 3. Электрофорез реакционных смесей, образующихся в результате обработки продуктов лигирования в комплексах (а) и (в) 0,5 М водным раствором этилендиамина (рН 8,0), 37° С. 5 — АССТАССр—NHCH₂COO—*рТGGTGGT; 1—4 — продукты его обработки в течение 1, 2,5, 12 и 24 ч соответственно; 6 — АССТАССр—*рТGGTGGT; 7 — продукт его обработки в течение 24 ч; 8 — *рТGGTGGT

переносится на NH₂-группу этилендиамина с образованием NH₂(CH₂)₂·NH—*рТGGTGGT. В случае соединения (IV) единственным продуктом реакции, обнаруживаемым при электрофоретическом разделении, является *рТGGTGGT. Это однозначно говорит о том, что атака NH₂-группы этилендиамина идет не по фосфатной группе ацилфосфатной связи соединения (IV) (в этом случае наблюдали бы образование этилендиаминного производного гептануклеотида NH₂(CH₂)₂NH—*рТGGTGGT, как и в случае олигонуклеотида (IV)), а по карбоксильной группе. Аналогичный ход реакции зафиксирован при выдерживании соединения (IV) в 0,4 М метилимидазольном буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl и 0,12 М MgCl₂ (24 ч, 20° С), а также при обработке его смесью пиридин — триэтиламин — вода (2 : 3 : 5) (12 ч, 20° С). Тот же результат мы получили при аналогичном исследовании тех же самых модифицированных тетрадекануклеотидов, но несущих 5'-³²P-концевую метку (в этом случае при обработке соединения (IV) водным раствором этилендиамина мы фиксировали образование амида гептануклеотида (I)). Описанные выше реакции не только иллюстрируют нуклеофильное замещение в олигонуклеотидах, содержащих ацилфосфатную межнуклеотидную связь, но и могут служить подтверждением структуры последней.

Таким образом, в настоящей работе впервые осуществлен синтез ДНК-дуплекса, содержащего в заданном месте сахарофосфатного остова ацилфосфатную связь. Показано, что эта связь при прочих равных условиях образуется быстрее, чем замещенная пирофосфатная связь, и количественно расщепляется под действием тех же нуклеофильных агентов, которые расщепляют и замещенную пирофосфатную связь, однако она более лабильна и соответственно более реакционноспособна. Важно отметить, что в отличие от олигонуклеотидов с замещенной пирофосфатной связью, которые являются фосфорилирующими агентами, олигонуклеотид, содержащий ацилфосфатную межнуклеотидную связь, оказался эффективным ацилирующим агентом. На наш взгляд, несомненное преимуще-

щество вышеизложенного метода заключается в том, что все стадии синтеза выполнены на незащищенных олигонуклеотидах в водной среде. Это, возможно, открывает путь к модификации природных фрагментов нуклеиновых кислот.

Соединения с ацилфосфатной межнуклеотидной связью могут использоваться в различных исследованиях, связанных с необходимостью направленного расщепления олигодезоксирибонуклеотидов, а также в качестве аффинных реагентов для зондирования активных центров белков, узнающих определенные нуклеотидные последовательности.

Экспериментальная часть

В работе использованы EDAC, MES (Merck, ФРГ), АТФ, этиловый эфир глицина (Serva, ФРГ); биогель Р-2, 200—400 меш (Bio-Rad, США); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ (1000 Ки/моль; «Изотоп»). $5\text{-}^{32}\text{P}$ -метку вводили фосфорилированием олигонуклеотидов с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Концентрацию олигонуклеотидного материала определяли спектрофотометрически в расчете на мономерное звено.

Буферы: 0,05 М MES (рН 6,0), содержащий 0,02 М MgCl_2 (А); 0,05 М трис-борат (рН 8,5), содержащий 1 мМ EDTA (Б); 0,4 М N-метилимидазол (рН 8,0), содержащий 0,2 М NaCl и 0,12 М MgCl_2 (В).

Конденсация олигонуклеотидов под действием EDAC. 0,1—2,0 ОЕ₂₆₀ смеси эквимольных количеств олигонуклеотидов в буфере А (суммарная нуклеотидная концентрация 10^{-3} М) обрабатывали 1—2 сут 0,1 М EDAC при 0° С. Разделение реакционных смесей после окончания реакции проводили ионообменной микроколоночной хроматографией на колонке (1 × 60 мм) с полисилилом СА в 20% ацетонитриле в градиенте концентраций пиррофосфата натрия (0—0,12 М) при рН 6,5, а также электрофорезом ^{32}P -меченых соединений в пластинах (20 × 60 × 0,04 см) 20% ПААГ, содержащего 7 М мочевины в буфере В при постоянном напряжении 1000 В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шабарова З. А., Меренкова И. Н., Орецкая Т. С., Соколова Н. И. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1287—1290.
2. Furdon P. J., Dominski Z., Kole R. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 22. P. 9193—9204.
3. Cosstick R., Eckstein F. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 14. P. 3430—3438.
4. Sayers J. R., Schmidt W., Eckstein F. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 3. P. 791—802.
5. Marcus-Sekura C. J., Woerner A. M., Shinozuka K., Zon G., Quinnan G. V. // Nucl. Acids. Res. 1987. V. 15. № 14. P. 5749—5763.
6. Agrawal S., Goodchild J., Civeiera M. P., Thornton A. M., Sarin P. S., Zamecnik P. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 10. P. 7079—7083.
7. Grandas A., Marshall W. S., Nielsen J., Caruthers M. N. // Tetr. Lett. 1989. V. 30. № 5. P. 543—546.
8. Stawinski J., Thelin M., Zain R. // Tetr. Lett. 1989. V. 30. № 16. P. 2157—2160.
9. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. М.: Мир, 1983. С. 426—428.
10. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. С. 180—185.
11. Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Готтих М. Б., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 490—499.
12. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 394—400.
13. Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 219—225.
14. Кузнецова С. А., Кубарева Е. А., Орецкая Т. С., Долинная Н. Г., Крынецкая Н. Ф., Громова Е. С., Шабарова З. А., Цех Д. // Биополимеры и клетка. 1987. Т. 3. № 6. С. 283—289.
15. Ivanovskaya M. G., Gottikh M. B., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 5. P. 913—934.
16. Krynetskaya N. F., Zayakina G. V., Volkov E. M., Oretskaya T. S., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 1. P. 33—45.

17. *Shabarova Z. A.* // *Biochimie*. 1988. V. 70. № 5. P. 1323—1334.
18. *Мижельсон А. М.* *Химия нуклеозидов и нуклеотидов*. М.: Мир, 1962. С. 253—255.
19. *Долинная Н. Г., Цытович А. В., Сергеев В. Н., Герцюк М. Н., Шабарова З. А.* // *Биоорг. химия*. 1990. Т. 16. № 9. С. 1183—1194.

Поступила в редакцию
16.I.1991

После доработки
12.V.1991

S. A. KUZNETSOVA, M. G. IVANOVSKAYA, Z. A. SHABAROVA
**CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS.
XIII. DIRECTED INTRODUCTION OF ACYLPHOSPHATE BOND
INTO DNA DUPLEX STRUCTURE**

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow】

DNA duplex, containing an acylphosphate internucleotide bond in a predetermined position of the sugar-phosphate backbone, was synthesized. The synthesis was carried out by condensing on the complementary matrix two heptanucleotides, one of which possessed at the 3'-end a glycine residue, connected with the oligonucleotide by the phosphoramidate bond, whereas the 5'-end phosphate group of the other was activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC). The yield of the oligonucleotide with an acylphosphate bond was 24%. The stability and chemical properties of the synthesized compound were studied in comparison with analogous oligonucleotide containing a substituted pyrophosphate internucleotide bond. The former was shown to be an effective acylating agent in the aqueous medium in contrast to the latter which is a phosphorylating agent.