



УДК 577.152.314'135 : 577.113.6

© 1991 г.

*М. О. Тахтакишвили, А. Табджун***ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ
6-О-АЛКИЛИРОВАННЫЙ ПО ГУАНИНУ УЧАСТОК УЗНАВАНИЯ
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *HaeIII****Химический факультет Тбилисского государственного университета, Тбилиси*

Фосфотриэфирным методом синтезирован ряд самокомплементарных дезокси-декануклеотидов, содержащих нормальный или модифицированный *HaeIII*-сайт GGCC (один или оба гуаниновых остатка 6-О-цетилированы). В то время как немодифицированный декануклеотид нормально гидролизует фосфодиэстеразой змеиного яда и рестриктазами *HaeIII* и *VspI*, введение объемистого 6-О-алкильного заместителя сильно ингибирует гидролиз фосфодиэстеразой и полностью подавляет расщепление эндонуклеазами рестрикции.

Наличие множества разнообразных природных нуклеозидов и их синтетических аналогов позволяет исследовать соотношение между их строением и химическими и биологическими свойствами, вплоть до прогнозирования биологически активных структур [1]. Значительный интерес представляет изучение зависимости между субстратной специфичностью ферментов нуклеинового обмена и структурой их субстратов, в том числе содержащих модифицированные мономеры. В этом отношении довольно широко исследуются эндонуклеазы рестрикции II класса, узнающие четырех—восьминуклеотидную (в большинстве случаев палиндромную) последовательность оснований в составе ДНК и расщепляющие молекулу ДНК в строго определенных местах [2]. Относительно простое строение этих ферментов и доступность их природных и синтетических субстратов (в том числе олигонуклеотидов, содержащих участок узнавания рестриктазы) делает их удобными объектами при изучении белок-нуклеинового взаимодействия, позволяя варьировать нуклеотиды внутри и непосредственно за пределами участка узнавания, менять их последовательность или заменять на модифицированные аналоги, оставлять разрывы или пропуски в одной из цепей двухцепочечного субстрата.

Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие участок узнавания эндонуклеазы рестрикции, удобно получать химическим синтезом исходя из природных и синтетических мономеров. В настоящей работе в качестве модифицированного звена был использован 6-О-цетилдезоксигуанозин — одно из ранее описанных 6-О-алкильных производных этого нуклеозида [3], играющих роль мутагенных и канцерогенных факторов в составе нуклеиновых кислот [4—8]. С использованием этого мономера мы синтезировали самокомплементарные олигодезоксинуклеотиды (I)—(V), содержащие последовательность (5')GGCC — участок узнавания рестриктазы *HaeIII*. Олигонуклеотиды были синтезированы фосфотриэфирным методом в растворе [9] из пентануклеотидов, каждый из которых в свою очередь был получен из 5'-концевого динуклеотида и 3'-концевого тринуклеотида, и после деблокирования очищены электрофорезом в ПААГ. В первом из полученных соединений *HaeIII*-сайт (подчеркнут) присутствует в нативном виде, тогда как в остальных один из гуаниновых остатков (внешний или внутренний) или оба содержат 6-О-цетильную группу.

Сокращения: G^R — 6-OR-дезоксигуанозин; префикс «d» в обозначениях дезокси-нуклеотидов и дезоксинуклеозидов всюду опущен.

5' CGTG^RG^{R'}CCACG TCAG^RGCCTGA 3'

I: R=R'=H V: R=C₁₆H₃₃, R'=H
 II: R=H, R'=C₁₆H₃₃
 III: R=C₁₆H₃₃, R'=H
 IV: R=R'=C₁₆H₃₃

Мы исследовали взаимодействие этих олигонуклеотидов (после их ферментативного 5'-³²P-мечения) с фосфодиэстеразой змеиного яда, а также с эндонуклеазами рестрикции *Hae*III и ее изошизомером *Bsp*I, анализируя реакционные смеси электрофорезом в денатурирующем ПААГ. В соответствующих условиях немодифицированный субстрат (I) претерпевал полный или частичный фосфодиэстеразный гидролиз (с образованием соответственно [5'-³²P]C и полного набора продуктов гидролиза с 3'-конца) или же сайт-специфическое расщепление каждой из двух рестриктаз с образованием пентануклеотида [5'-³²P]CGTGG; последний идентифицировали электрофоретически путем прямого сравнения с соответствующим продуктом частичного гидролиза декануклеотида (I). В то же время модифицированные декануклеотиды (II)–(V) оказались малореакционноспособными: их фосфодиэстеразный гидролиз сильно затруднен (не удается обнаружить продуктов гидролиза короче октануклеотида), а расщепление рестриктазами полностью подавлено.

В принципе изошизомеры могут проявлять неодинаковые требования к структуре рестриктового сайта, в частности различную специфичность к модифицированным участкам узнавания. Представляет интерес, варьируя параметры реакции, изучать функционирование ферментов рестрикции-модификации в неоптимальном режиме, особенно в условиях сниженной жесткости требований к структуре субстрата, когда ферменты способны проявлять различную реакционную способность в отношении модифицированных сайтов. Такие исследования позволяют как бы расчленять сайт и детализировать роль отдельных структурных элементов участка узнавания в формировании реакционной конформации субстрата и фермент-субстратного комплекса, оценивать вклад в общую реакционную способность неканонической формы фермента, образующейся в неоптимальных условиях реакции.

В случае синтезированных нами субстратов (I)–(V) мы попытались повысить (точнее, расширить) реакционную способность эндонуклеаз *Hae*III и *Bsp*I за счет снижения специфичности фермент-субстратного взаимодействия путем введения в реакционную смесь органических соединений с высокой диэлектрической проницаемостью (глицерин, DMSO, DMF, MeCONMe₂; ср., например, повышение в этих условиях реакционной способности еще одного изошизомера *Hae*III — рестриктазы *Bsu*I [10]). Однако в данном случае такие модификации условий оказались неэффективными и практически не изменили картины гидролиза.

Предполагается, что изошизомер *Bsu*I взаимодействует с ДНК в большом желобе двойной спирали, *Bsp*I — в малом желобе, а *Hae*III — в обоих [11]. Возможно, появление в области рестриктового сайта объемистой гидрофобной группы препятствует нормальному связыванию фермента и подавляет реакцию олигонуклеотидов как с *Hae*III, так и с *Bsp*I.

Экспериментальная часть

В работе использовали нуклеозиды производства опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР (Новосибирск) и СКТБ БАВ (Бердск), дитиотреит (Calbiochem), трис, акриламид, бисакриламид, EDTA (Serva), персульфат аммония, красители (Reanal), сефадекс G-50 (Pharmacia), дауэкс 50W × 8 (BioRad), [γ -³²P]rATP (Amersham), фосфодиэстеразу змеиного яда (Worthington), Т4-полинуклеотидкиназу и эндонуклеазы рестрикции *Bsp*I (НПО «Фермент», Вильнюс) и *Hae*III (Boehringer).

Киназный буфер — 50 мМ трис-НСl (рН 8,8), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит; буфер для рестриктаз — 25 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl; ТВЕ-буфер (для электрофореза в ПААГ) — 50 мМ

трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA; ТЕ-буфер (для гель-фильтрации) — 1 мМ трис-НСl (рН 8,0), 0,1 мМ EDTA.

Олигонуклеотиды синтезировали блочным фосфотриэфирным методом [9], для удаления защитных групп использовали методики [9, 12—14]. Аналитический и препаративный электрофорез проводили в блоке 20% ПААГ (акриламид — метиленбисакриламид, 20 : 1), содержащего 7 М мочевины, в ТЕ-буфере; вещества наносили в 90% формамиде, содержащем 0,2% бромфеноловый синий и ксиленцианол FF; детекция в УФ-свете (254 нм) или радиоавтографией (на пленке РТ-1 или РМ-1). Из геля олигонуклеотиды элюировали 2 М LiClO₄ в ТЕ-буфере и осаждали 4-кратным объемом ацетона, после чего проводили гель-фильтрацию на сефадексе G-50 в ТЕ-буфере.

5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов и частичный гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда осуществляли как описано в работе [15], *Hae*III- и *Bsp*I-гидролиз — в условиях, рекомендуемых поставщиком, обработку рестриктазами в условиях сниженной специфичности — аналогично методу [10], добавляя в реакционную смесь глицерин, DMSO, DMF или MeCONMe₂ в концентрации до 35%.

Авторы благодарны Ю. А. Берлину за интерес к работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antiviral Drug Development. A Multidisciplinary Approach / Eds De Clercq E., Walker R. T. London: Plenum Press, 1988.
2. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. Supplement. P. 2331—2365.
3. Тактакишвили М. О., Табджун А., Ярцева И. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 59—68.
4. Mehta J. B., Ludlum D. B. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 521. № 3. P. 770—775.
5. Gerchman L. L., Ludlum D. B. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 308. № 1. P. 310—316.
6. Singer B. // Nature. 1976. V. 264. № 5631. P. 333—337.
7. Schendel P. F., Robins P. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 19. P. 6017—6023.
8. Cairns J. // Nature. 1981. V. 289. № 5806. P. 353—361.
9. Sproat B. S., Gait M. J. // Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach. / Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 83—115.
10. Heininger K., Horz W., Zachan H. G. // Gene. 1977. V. 1. № 3. P. 291—303.
11. Wolfes H., Fliess A., Pingoud A. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 1. P. 105—110.
12. Буткус В. В., Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н., Смирнов И. В. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 11. С. 1518—1530.
13. Reese C. B., Zard L. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 18. P. 4611—4626.
14. Kamimura T., Tsuchiya M., Urakami K., Koura K., Sekine M., Shinozaki K., Miura K., Hata T. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 16. P. 4552—4557.
15. Берлин Ю. А., Каган М. З., Колосов М. Н., Коробко В. Г. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 8. С. 1063—1072.

Поступила в редакцию
5.IX.1990

После доработки
4.I.1991

М. О. ТАКТАКИШВИЛИ, А. ТАБДЖУН

OLIGODEOXYNUCLEOTIDES CONTAINING A *Hae*III RESTRICTION SITE WITH 6-O-ALKYLATED GUANINE RESIDUE(S)

Department of Chemistry, Tbilissi State University, Tbilissi

A series of self-complementary decadeoxynucleotides containing a native or modified *Hae*III site GGCC (with one or both guanine residues 6-O-cetylated) have been synthesized by the phosphotriester approach. The nonmodified decanucleotide is normally digested with snake venom phosphodiesterase as well as with *Hae*III and *Bsp*I restriction endonucleases, whereas the bulky 6-O-alkyl substituent strongly inhibits the VPDE hydrolysis and completely prevents digestion with the endonucleases.