



УДК 577.113.4

© 1992 г.

*Н. И. Мерешкова, Н. Г. Долинная, Т. С. Ореукая,
Н. И. Соколова, З. А. Шабарова*

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

ХIV. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ФОСФОДИЭФИРНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ РАЗЛИЧНЫМИ НУКЛЕОТИДНЫМИ ЗВЕНЬЯМИ

Химический факультет и Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Показано, что эффективность матрично-направленной конденсации олигонуклеотидов зависит от природы нуклеотидов, между которыми образуется новая фосфодиэфирная связь. Наблюдаемая зависимость выходов реакций образования межнуклеотидной связи практически одинакова при использовании в качестве конденсирующего агента как водорастворимого карбодимида, так и BrCN. Обсуждается взаимосвязь эффективности химического лигирования и локальной конформации ДНК.

В последние годы в нашей лаборатории активно разрабатывается метод сборки двуспиральных ДНК из олигонуклеотидных блоков под действием химических реагентов (химическое лигирование, ХЛ) [1]. В качестве таких реагентов успешно используются водорастворимый карбодимид [1, 2] и BrCN [3]. Преимуществом последнего является высокая скорость реакции (время реакции составляет 1 мин) и отсутствие побочных продуктов. ХЛ позволяет значительно расширить масштаб синтеза протяженных ДНК, автоматизировать его, а также получать ДНК-дуплексы с точечными модификациями углеводофосфатного остова, введение которых невозможно прямым химическим синтезом. Ранее нами было замечено, что эффективность ХЛ зависит от природы нуклеотидных остатков, между которыми образуется новая межнуклеотидная связь. Это было показано при индуцируемой водорастворимым карбодимидом сборке 35-звенного ДНК-дуплекса из шести олигомерных блоков [4] и при химической репарации одноцепочечного разрыва в 15–17-звенных дуплексах [5], причем отмеченная закономерность сохранялась вне зависимости от положения фосфатной группы в нике (5'- или 3'-концевая).

В настоящей работе проведено сравнительное изучение эффективности ХЛ для 14 из 16 возможных комбинаций нуклеотидов в двойной спирали ДНК. Исследование проводилось на серии трехкомпонентных комплексов (I)–(XV), состоящих из двух олигонуклеотидов и комплементарной им матрицы. Следует отметить, что нуклеотидные последовательности, фланкирующие участок лигирования, были различны. Эксперименты проводились параллельно как с 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимидом (CDI), так и с использованием BrCN. Полученные результаты подтвердили сильную зависимость эффективности ХЛ от природы нуклеотидов, участвующих в реакции. Обнаруженные закономерности важны для практического применения метода ХЛ, так как позволяют перед синтезом планировать оптимальную разбивку целевых ДНК-дуплексов на блоки таким

Префикс «d» в структурах олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

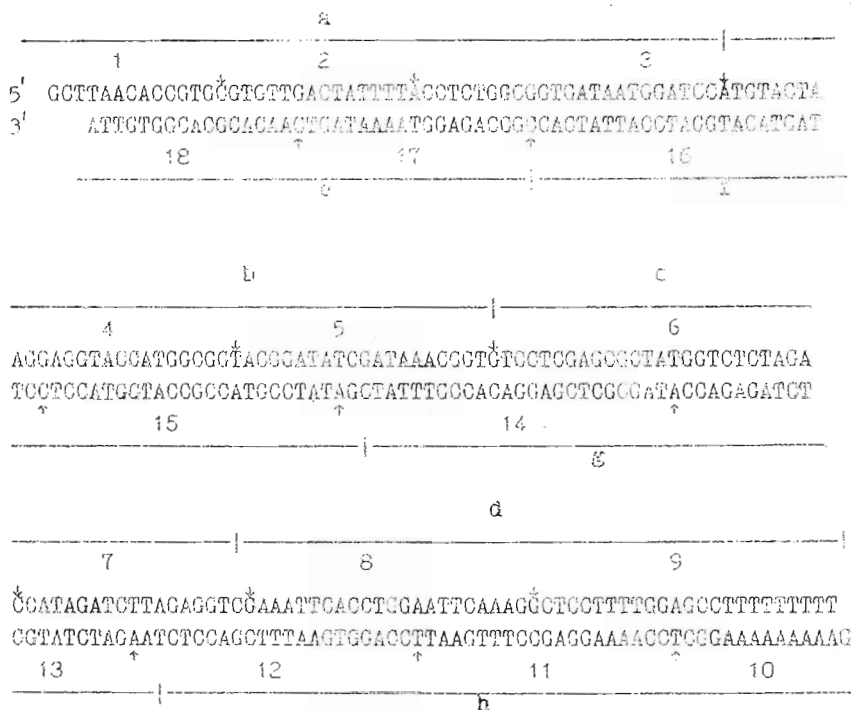


Рис. 1. Разбивка 183-звенного ДНК-дуплекса на блоки. Цифрами указаны короткие фрагменты; стрелка указывает начало фрагмента. Латинскими буквами обозначены более протяженные фрагменты

образом, чтобы в месте «сшивания» находились наиболее реакционноспособные нуклеотидные пары.

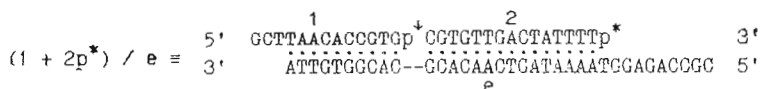
Чтобы приблизить наши модельные системы к реальной ситуации сборки протяженных ДНК, мы разбивали на фрагменты 183-звенный ДНК-дуплекс [6]. Разбивка производилась таким образом, чтобы в месте контакта олигомеров находились различные нуклеотидные остатки. При этом следили за тем, чтобы перекрывающиеся участки олигонуклеотидов были достаточно длинными и не образовывали альтернативных структур. На рис. 1 приведен 183-звенный дуплекс с вариантом разбивки на блоки, позволившим промоделировать 14 из 16 возможных нуклеотидных контактов в двойной спирали. Во всех изученных дуплексах в реакционных центрах сближены 3'-фосфатная группа одного олигомера и 5'-гидроксильная группа другого. Ряд контактов был проверен повторно с использованием более протяженных матриц (рис. 1, блоки а—h). Состав исследуемых трехкомпонентных комплексов (I)–(XV) приведен в таблице. В трехкомпонентных комплексах (I)–(XV) длина перекрывающихся блоков составляет не менее 8 нуклеотидных пар, что обеспечивает стабильность комплексов при температуре $<20^{\circ}\text{C}$ [4].

Результаты ХЛ, индуцируемого СДИ (за 48, 96 и 144 ч) и ВгСН в комплексах (I)–(XV), суммированы в таблице. Видно, что выходы продуктов реакции колеблются от 10 до 94% в зависимости от природы нуклеотидов, между которыми образуется новая межнуклеотидная связь. Оказалось, что изменение длины матрицы в некоторых случаях существенно влияет на выходы продуктов лигирования (ср., например, дуплексы (IV) и (IV'), (X) и (X')). Это не очевидное на первый взгляд явление

Химическое лигирование в трехкомпонентных комплексах

Номер соединения	Состав комплексов *	Нуклеотидные остатки в ннкс	Выход продукта, % ($\pm 2\%$)			
			BrCN	CDI		
				1 мин	48 ч	96 ч
(I)	(1+2p*)/e	Gp+C	87	80	88	90
(II)	(2+3p*)/e	Tr+A	51	50	65	75
(III)	(16+ep*)/a	Cr+C	42	19	37	38
(IV)	(3+4p*)/16	Cr+A	33	10	12	19
(IV')	(3+4p*)/f	Cr+A	19	13	18	20
(V)	(15+16p*)/4	Tr+C	79	59	60	67
(V')	(15+16p*)/b	Tr+C	76	75	78	83
(VI)	(4+5p*)/15	Gp+T	83	68	72	83
(VI')	(4+5p*)/f	Gp+T	88	75	77	88
(VII)	(14+15p*)/5	Cr+A	33	16	20	22
(VII')	(14+15p*)/b	Cr+A	46	51	54	57
(VIII)	(5+6p*)/14	Tr+G	31	29	33	39
(VIII')	(5+6p*)/g	Tr+G	39	34	43	58
(IX)	(13+14p*)/6	Cr+A	25	19	26	39
(IX')	(13+14p*)/c	Cr+A	53	30	39	57
(X)	(6+7p*)/13	Ap+C	47	48	52	59
(X')	(6+7p*)/g	Ap+C	72	38	41	69
(XI)	(12+13p*)/7	Ap+A	62	28	34	52
(XII)	(7+8p*)/12	Cr+G	58	30	33	38
(XIII)	(11+12p*)/d	Tr+T	81	66	72	85
(XIV)	(8+9p*)/h	Gp+G	50	13	15	17
(XV)	(10+11p*)/9	Cr+T	89	82	89	94

* Состав комплексов расшифрован на примере (I):



p* — ³²P-меченая фосфатная группа на 3'-конце соответствующего олигонуклеотида; комплексы имеющие одинаковое цифровое обозначение, различаются только матричными олигонуклеотидами.

(уменьшение выхода продукта ХЛ при увеличении длины матрицы) требует дополнительного исследования.

Прослеживается определенная корреляция в действии обоих конденсирующих реагентов, несмотря на различия в механизме их действия и скоростях реакций. Подобная закономерность отмечалась и ранее для семейства дуплексов, содержащих различные структурные аномалии в реакционном центре [7]. Совокупность этих данных позволяет предположить, что различия выходов продуктов реакции ХЛ могут быть обусловлены возмущениями локальной структуры ДНК, отражающимися в различной взаимной ориентации взаимодействующих 3'-фосфатной и 5'-гидроксильной групп. Наличие таких возмущений было обнаружено с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) монокристаллов ДНК-дуплексов [8]. В литературе высказывается несколько гипотез о причинах вариабельности структуры В-ДНК от нуклеотидной последовательности: 1) локальные конформационные подстройки, такие, как изменение угла наклона пар оснований относительно оси спирали, сдвиг нуклеотидных пар и т. д., смягчающие энергетически невыгодные столкновения пуриновых оснований противоположных цепей в малой бороздке — например, наиболее неблагоприятные столкновения наблюдаются для 5'-Ру Ру-последовательностей (см. правила Калладина [9]); 2) специфическая геометрия стэкинг-

взаимодействий разных нуклеотидных пар, обуславливающая вариации локальных параметров спирали и торсионных углов углеводофосфатного остова [10].

Основным возражением против нашей интерпретации причин зависимости эффективности лигирования от природы взаимодействующих нуклеотидов является наличие одноцепочечного разрыва, который может нарушить тонкие структурные подстройки, увеличивая степени свободы ковалентно не связанных фрагментов углеводофосфатного остова. Однако недавние исследования с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения и РСА ник-содержащих и интактных ДНК-дуплексов показали, что одноцепочечный разрыв практически не вызывает искажения структуры ДНК [11, 12]. В настоящее время самым информативным методом исследования тонкой структуры ДНК в растворе является ЯМР высокого разрешения. Недавно Д. Горенштейн и др. [13] продемонстрировали, что с помощью ^{31}P -ЯМР-спектроскопии можно проследить за специфическими структурными вариациями вдоль цепи ДНК. Авторы полагают, что за изменение значения химических сдвигов ^{31}P -ЯМР-спектров (химические сдвиги отнесены для каждого межнуклеотидного фосфата обеих цепей олигомерных ДНК-дуплексов) ответственны торсионные углы углеводофосфатного остова, главным образом, ζ , $\text{C3}'\text{-O3}'\text{-P-O5}'$ — наиболее переменный в В-ДНК [13, 14]. Используя измеренные константы спин-спинового взаимодействия, ($J_{\text{H3}'\text{-P}}$) и соотношение Карплуса, авторы рассчитали ζ для олигонуклеотидных дуплексов в растворе и получили четкую корреляцию между значениями ζ для данной межнуклеотидной фосфодиэфирной связи и положением сигнала в спектре [13]. Кроме того, наблюдалась корреляция между значениями химических сдвигов сигналов ^{31}P -ЯМР-спектров (δ) и углом поворота пар оснований друг относительно друга (спиральный твист), а также некоторыми другими локальными параметрами В-ДНК.

На основании анализа литературных данных, полученных методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии [13], и результатов ХЛ в дуплексах (I)–(XV) (таблица) мы обнаружили общую тенденцию в изменении сравниваемых параметров: смещение сигналов ^{31}P -ЯМР-спектров фосфатных групп и колебание выхода продуктов ХЛ (см. кривые на рис. 2а, б). Следует отметить, что на концах спирали, где возможна повышенная конформационная подвижность спаренных фрагментов (так называемое «обтрепывание»), сигналы ^{31}P -ЯМР фосфатных групп также хорошо разрешимы и не нарушают отмеченных закономерностей.

Корреляция между значением δ сигнала ^{31}P -ЯМР-спектра и выходом продукта лигирования прослеживается и на других системах. Так, известно, что В→А-переход ДНК сопровождается расплетанием двойной спирали и уменьшением угла поворота пар оснований с $36,0$ до $32,7^\circ$ [8, 14]. Это проявляется в кооперативном сдвиге сигналов ^{31}P в слабое поле на $0,2\text{--}0,3$ м. д. [15] и падении выхода продуктов ХЛ в 2–3 раза при замене в участке сшивания дезоксирибозного звена на рибозное или при лигировании РНК-фрагментов [2, 16].

Таким образом, на основании полученных данных можно, по-видимому, говорить о том, что ХЛ чувствительно даже к незначительным структурным изменениям в нике. Существенно, что полученные закономерности мало зависят от природы конденсирующего реагента. Дальнейшее исследование этого интересного феномена позволит решить ряд важных теоретических вопросов, касающихся органической химии нуклеотидных комплексов: 1) действительно ли изменение эффективности химической реакции в дуплексе или другой организованной нуклеотидной структуре отражает вариации локальной конформации в месте «сшивания», обусловленные нуклеотидной последовательностью, модификацией отдельных звень-

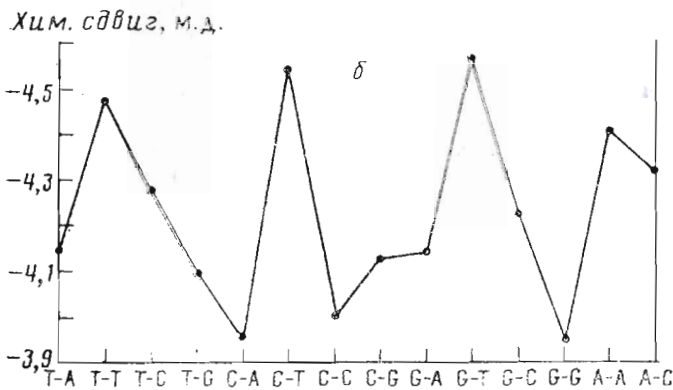
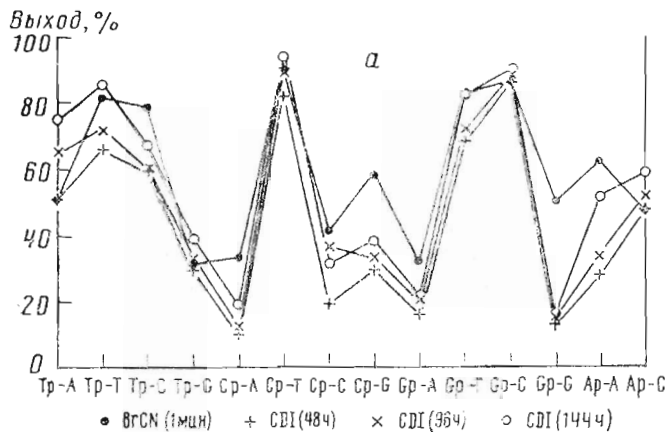


Рис. 2. а — выход продуктов ХЛ в зависимости от последовательности нуклеотидных звеньев, между которыми образуется новая фосфодиэфирная связь: направление цепи 5'→3'. б — зависимость химических сдвигов сигналов ³¹P-ЯМР-спектров от природы звеньев, окружающих данную фосфодиэфирную связь в двуспиральных ДНК-дуплексах; направление цепи 5'→3'. Данные взяты из работы [13]

ев, изменением общей геометрии молекулы (В→А, В→Z-переходы) и др.; 2) зависит ли эффективность лигирования от последовательности, фланкирующей данный нуклеотидный контакт, или этот параметр является функцией только двух нуклеотидных пар в нике; 3) каково влияние одноцепочечного разрыва на локальную конформацию, в какой степени она «заморожена» комплементационными и стэкинг-взаимодействиями соседних звеньев. Кроме того, по-видимому, определенный вклад в эффективность химического лигирования вносит реакционная способность гидроксильной и фосфатной группы, которая может различаться для различных нуклеотидов.

В практическом плане полученные результаты позволят еще до синтеза производить разбивку протяженных ДНК-последовательностей на блоки оптимальным образом, с тем чтобы успешно и быстро лигировать их с помощью BrCN.

Экспериментальная часть

В работе использовали MES, CDI, BrCN (Merck, ФРГ), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметиленамин, 1,4-дифосфат (Serva, ФРГ), [α -³²P]UTP («Изотоп», СССР), терминальную трансферазу (НПО «Ферментас», Литва).

Олигонуклеотиды 7–12, 14–16 с концевыми фосфатными группами получали гидрофосфорильным методом в полуавтоматическом режиме как описано в работе [17]. Олигонуклеотиды 1–6, 13, 17, 18 получали амидофосфитным методом на синтезаторе «Виктория 4М» [18]. Источником концевой фосфатной группы в этом случае являлся 3'-рибоуридин [19]. Синтезированные олигонуклеотиды были проанализированы и выделены с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [20]. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов а–к проводили амидофосфитным методом на синтезаторе «Cyclo DNA synthesizer» (Biosearch, США). После удаления защитных групп олигомеры обессоливали на биогеле Р–2 и выделяли методом препаративного электрофореза в 8% денатурирующем полиакриламидном геле. 3'-Фосфорилирование олигомеров проводили с помощью [α - 32 P]УТР и терминальной трансферазы по методике [19]. Первичная структура олигонуклеотидов подтверждена анализом по модифицированной методике Максама–Гилберта [21].

Использованы следующие буферные растворы: 0,25 М MES, доведенный Et₃N до pH 7,5, 0,02 М MgCl₂ (буфер А); 0,05 М MES (pH 6,0), 0,02 М MgCl₂ (буфер Б); 1 М ацетат калия (pH 8,0); для терминальной трансферазы – 200 мМ К-какодилат (pH 7,5), 1 мМ CoCl₂, 0,5 мМ DTT.

Электрофорез олигонуклеотидов проводили в 8% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. После автордиографии радиоактивность вырезанных из геля зон определяли по Черенкову на счетчике «Delta-300» (Трасор, Нидерланды). Выход реакции ХЛ определяли по отношению радиоактивности продукта к суммарной радиоактивности исходного олигонуклеотида и продукта.

Химическое лигирование. 0,1 мМ раствор олигонуклеотидов (дуплексы (I)–(XV)) смешивали в следующем соотношении: 3'- 32 P-меченый олигомер – олигомер-донор фосфата – матрица = 1 : 1,2 : 1,5.

а) под действием бромциана реакцию проводили в 10 мкл буфера А в течение 1 мин при 0° С. BrCN (1 мкл) добавляли в виде 10 М раствора в абс. ацетонитриле. *б) под действием карбодиимида* реакцию проводили в 10 мкл буфера Б в темноте при 0° С. CDI добавляли до концентрации 0,2 М. Через 48, 96, 144 ч отбирали аликвоты реакционной смеси. Нуклеотидный материал осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в 8% ПААГ.

Авторы выражают благодарность сотрудникам химического факультета МГУ В. Н. Сергееву и В. Н. Ташлицкому, аспиранту Т. Г. Рейнтамму за помощь при синтезе и анализе олигонуклеотидов, Е. А. Романовой за критическое прочтение работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shabarova Z. A. // Biochimie. 1988. V. 70. № 10. P. 1323–1334.
2. Dolinnaya N. G., Sokolova N. I., Gryaznova O. I., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids. Res. 1988. V. 16. № 9. P. 3721–3738.
3. Sokolova N. I., Ashirbekova D. T., Dolinnaya N. G., Shabarova Z. A. // FEBS Lett. 1988. V. 232. № 1. P. 153–155.
4. Шабарова З. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Пурмаль А. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 628–642.
5. Долинная Н. Г., Цытович А. В., Тевосян С. Г., Сергеев В. Н., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1195–1209.
6. Шабарова З. А., Меренкова И. Н., Орецкая Т. С., Соколова Н. И. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1287–1289.
7. Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 166–174.
8. Drew H. R., Wing R. M., Takano T., Broka C., Tanaka S., Itakura K., Dickerson R. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 4. P. 2179–2183.
9. Calladine C. R. // J. Mol. Biol. 1982. V. 161. P. 343–352.
10. Savai A., Mazur J., Nussinov R., Jernigan R. L. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 22. P. 8498–8502.

11. *Pieters J. M. L., Mans R. M. W., van den Elst H., van der Marel G. A., van Boom J. H., Altona C.* // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4551–4565.
12. *Aytami J., Coll M., van der Marel G. A., van Boom J. H., Wang A. H.-J., Rich A.* // Proc. Nat. Acad. Sci USA. 1990. V. 87. № 7. P. 2526–2530.
13. *Corenstein D. G., Schroeder S. A., Fu J. M., Metz J. T., Roongta V., Jones C. R.* // Biochemistry. 1988. V. 27. № 19. P. 7223–7237.
14. *Saenger W.* Principles of Nucleic Acids Structure. N. Y.: Springer-Verlag, 1984.
15. *Kupr J., Sklenar V.* // Biopolymers. 1986. V. 25. № 9. P. 1803–1812.
16. *Долинная Н. Г., Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И., Шабарова З. А.* // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1346–1355.
17. *Рейнгамм Т. Г., Меллер У., Орецкая Т. С., Шабарова З. А., Ломакин А. И.* // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 4. С. 524–530.
18. *Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орецкая Т. С., Потанов В. К., Шабарова З. А.* // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034–1039.
19. *Krynetskaya N. F., Zayakina G. V., Oretskaya T. S., Volkov E. M., Shabarova Z. A.* // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 1. P. 33–43.
20. *Шмидт С., Кузнецова Л. Г., Романова Е. А., Нимани А., Орецкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А.* // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 823–830.
21. *Rosental A., Schubert F., Cech D., Oretzkaja T. S., Kuznezova S. A., Shabarova Z. A.* // Biomed. and Biochim. Acta. 1985. V. 44. № 10. P. 75–83.

Поступила в редакцию
22.VII.1991

**I. N. MERENKOVA, N. G. DOLINNAYA, T. S. ORETSKAYA,
N. I. SOKOLOVA, Z. A. SHABAROVA**

**CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS.
XIV. THE EFFICIENCY OF PHOSPHODIESTER BOND FORMATION
BETWEEN VARIOUS NUCLEOTIDE UNITS**

*Department of Chemistry and A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Efficiency of the template-directed condensation of oligonucleotides depends on the nature of the nucleotide units to be joined. Fourteen out of sixteen dinucleotide combinations in double-stranded DNA were examined. Alterations of the reaction efficiency are identical for cyanogen bromide and 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide coupling reagents. Dependence of the chemical ligation efficiency on the DNA sequence-specific local conformation is discussed.