



УДК 547.963.32.057:542.95

© 1994 Т. С. Орецкая, Н. Г. Долинная,
И. Н. Меренкова, Н. Ф. Крынецкая, Е. А. Романова,
Е. М. Волков, М. Блюменфельд*, М. Вассер*, З. А. Шабарова

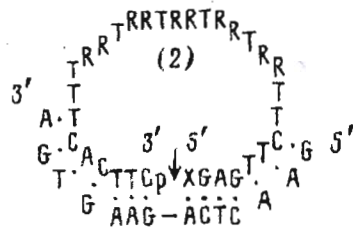
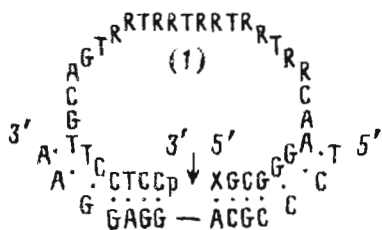
СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С НЕНУКЛЕОТИДНЫМИ ВСТАВКАМИ

*Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова;
Фирма «Genset», Париж

Один из важных факторов, препятствующих широкому использованию синтетических олигонуклеотидов в качестве антисенсов, — их чувствительность к деградации под действием клеточных нуклеаз — может быть устранен, если вместо природных олигомеров применять их циклические аналоги [1, 2]. Описано несколько методов получения циклических олигонуклеотидов: лигирование в составе трехспирального комплекса [1] и прямой химический синтез [3, 4]. Первый способ не универсален из-за специфичности кода узнавания третьей цепью ДНК-мишени и, таким образом, не пригоден для циклизации олигомеров любой нуклеотидной последовательности. В то же время второй метод не является сиквенсзависимым и, следовательно, мог бы быть перспективным, однако описанные в литературе результаты [3, 4] и наш анализ возможностей этого подхода свидетельствуют о том, что это сложная синтетическая задача.

Наилучшая стратегия получения циклических олигодезоксирибонуклеотидов, на наш взгляд, — циклизация синтетических линейных олигонуклеотидов на комплементарной матрице под действием бромистого циана (BrCN) (схема). Для повышения точности воздействия циклического зонда на НК-мишень, т. е. сведения к минимуму неспецифических контактов, а также для снижения вероятности образования шпильчатых структур (при использовании 36—40-звенного олигонуклеотида избежать внутримолекулярного структурирования весьма сложно) мы предлагаем заменить нуклеотидные остатки в незначительном участке антисенсового олигонуклеотида на остатки 1,2-дидезокси-*D*-рибофуранозы (R). Конформационная подвижность модифицированного участка в этом случае может облегчить образование цикла.

Опыт использования химического лигирования (ХЛ) [5] диктует ряд требований к дизайну линейных предшественников циклических олигонуклеотидов, которым мы следовали: а) длина олигонуклеотида была не меньше 32 звеньев, чтобы обеспечить образование стабильного дуплекса с матрицей (12—14 нуклеотидных пар) и достаточно длинный «огibaющий» одноцепочечный участок, не препятствующий полноценному комплексообразованию; б) реагирующая фосфатная группа локализована на 3'-конце линейного олигонуклеотида, что способствовало эффективному образованию фосфодизэфирной связи [6]; в) в участке лигирования контактировали нуклеотидные звенья, обеспечивающие наиболее эффективное ХЛ [7]. На схеме стрелкой указано положение новой межунонуклеотидной связи, приводящей к образованию циклического продукта.



$$X = T (1a, 2a)$$

$$X = pT (1b, 2b)$$

Модифицированные линейные предшественники циклических олигомеров (1a и 2a) содержали соответственно участки, комплементарные РНК вируса герпеса и 5S РНК *E. coli*. Синтез олигонуклеотидов (1a и 2a), а также 14-звенных матриц (схема) был осуществлен стандартным амидофосфитным методом на автомате-синтезаторе «Applied Biosystems 380B» с увеличением времени конденсации на стадии присоединения модифицированного звена до 3 мин. 3'-Амидофосфит 1,2-дидезокси-D-рибофуранозы получали как описано нами ранее [8]. Эффективность присоединения модифицированного звена, как правило, не отличалась от таковой для немодифицированного. 5'-³²P-фосфорилированные олигонуклеотиды (1б) и (2б) получали из олигомеров (1a) и (2a) соответственно с помощью T4-полинуклеотидкиназы. BrCN-Индуклируемая реакция проводилась в условиях, оптимальных для химического лигирования линейных олигонуклеотидов [7]. Общая нуклеотидная концентрация не должна превышать 10⁻⁴ М (на мономер), чтобы предотвратить конкурирующее образование димера исходного олигонуклеотида. Выход циклических олигомеров во всех четырех случаях (схема) составлял 90—95%. Циклизация нуклеотидного аналога соединения (1a) 5'-TGCGGGAACCTGTTGGTAAAATGGAAGACGTTCCCTCCp (3) протекает гораздо менее эффективно: выход циклического продукта не превышает 30% (рис. 1).

Циклическая природа выделенного с помощью электрофореза в денатурирующем 20% ПААГ продукта лигирования была подтверждена несколькими методами. Полученное соединение устойчиво к действию смеси ферментов — фосфоэстеразы змеиного яда и фосфомоноэстеразы, а также EhoVII. Кроме того, оно резистентно к введению 5'-³²P-метки под действием полинуклеотидкиназы и [γ -³²P]АТР (данные не показаны). Убедительным подтверждением циклической структуры олигонуклеотида является характер расщепления по одному из оснований (анализ по Максаму — Гилберту) компонентов реакционной смеси, содержащих до проведения циклизации 5'-концевую ³²P-метку (рис. 2). Электрофоретическая подвижность циклического олигонуклеотида с пиродифосфатной межнуклеотидной связью после первого же разрыва цепи скачкообразно меняется, совпадая с таковой для исходного олигомера (рис. 2), и олигонуклеотидную последовательность невозможно «прочитать» из-за того, что радиоактивная метка находится не на конце, а внутри анализируемой цепи.

Таким образом, разработан высокоэффективный и универсальный метод циклизации олигонуклеотидов — потенциальных антисенсов. Он предполагает включение в незначущую центральную часть олигомера ненуклеотидных вставок, сближение его концов на комплементарной матрице и ковалентное их соединение с помощью химического реагента.

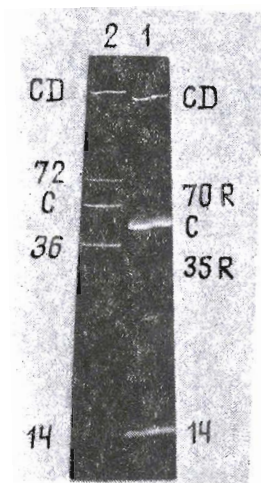


Рис. 1



Рис. 2

Рис. 1. Электрофоретический анализ в 20% денатурирующем ПААГ продуктов VgCN-индуцируемой циклизации олигонуклеотида (1а) (дорожка 1) и его нуклеотидного аналога (3) (дорожка 2). Цифры сбоку указывают число нуклеотидных или 1,2-дидезокси-*D*-рибофуранозных звеньев (например, 35R); С и CD обозначают циклический олигонуклеотид или цикл димерного продукта. Для визуализации соединений использовано прокрашивание бромистым этидием

Рис. 2. Авторадиограмма электрофореза в 20% ПААГ. Анализ нуклеотидной последовательности по Максаму — Гилберту олигонуклеотида (1б) (А) и продукта его циклизации (Б). Дорожки 1 соответствуют линейному (А) или циклическому (Б) олигонуклеотидам, не подвергавшимся расщеплению

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prakash G., Kool E. T. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1991. P. 1161—1163.
2. Prakash G., Kool E. T. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1992. V. 114. № 9. P. 3523—3527.
3. Yaman Rao M., Reese C. B. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 20. P. 8221—8239.
4. De Vroom E., Broxterman H. J. G., Sliedregt L. A. J. M., van der Marel G. A., van Boom J. H. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 10. P. 4607—4618.
5. Shabarova Z. A. // *Biochimie.* 1988. V. 70. P. 1323—1334.
6. Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 12. С. 166—174.

7. Меренкова И. Н., Долинная Н. Г., Орецкая Т. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 85—91.
8. Волков Е. М., Кубарева Е. А., Сергеев В. Н., Орецкая Т. С. // Химия природных соединений. 1990. № 3. С. 417—419.

Поступило в редакцию
13.VII.1993

*T. S. Oretskaya, N. G. Dolinnaya, I. N. Merenkova,
N. F. Krynetskaya, E. A. Romanova, E. M. Volkov,
M. Blumenfeld*, M. Vasseur*, Z. A. Shabarova*

**SYNTHESIS OF CYCLIC OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES
WITH NON-NUCLEOTIDE INSERTS**

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;
Genset Corporation, Paris

An effective method for the oligonucleotide cyclization using BrCN-induced chemical ligation was developed. The novel idea to incorporate non-nucleotide inserts makes the process of cyclizations independent of the inner secondary structure of the linear precursor. An set of assays were developed to confirm the cyclic structure of the compounds obtained.