



УДК 577.113.6 : 577.212.2

© 1994 О. Н. Королева, Е. М. Волков, В. Л. Друца

**КОНСТРУИРОВАНИЕ СМЕШАННЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ
ФРАГМЕНТОВ ДНК С КОНСЕНСУСНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ
ПРОМОТОРОВ, РАЗДЕЛЕННЫХ НЕНУКЛЕОТИДНЫМИ УЧАСТКАМИ**

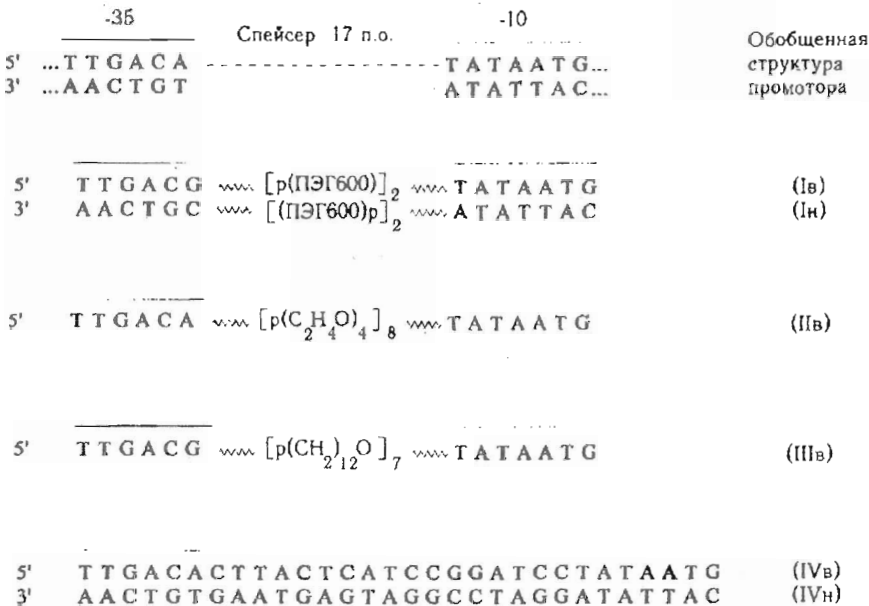
*Химический факультет и НИИ физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Ключевые слова: олигонуклеотиды модифицированные, синтез; полимеры ДНК-подобные, синтез; промоторы.

Твердофазным амидофосфитным методом синтезированы смешанные олигомеры, представляющие собой фрагменты ДНК, соединенные протяженными ненуклеотидными участками. Олигонуклеотидные составляющие смешанных олигомеров по структуре полностью или частично соответствуют консенсусным элементам прокариотических промоторов области —35-го (TTGACA) или —10-го (TATAATG) нуклеотидов. Ненуклеотидные участки, в максимально вытянутой конформации приближающиеся по длине к 17-звенным фрагментам ДНК, вводили в смешанные олигомеры непосредственно в процессе синтеза по олигонуклеотидной схеме с использованием амидофосфитных производных полиэтиленгликоля (ПЭГ600), тетраэтиленгликоля или додекандиола. Показано, что олигонуклеотидные составляющие смешанных олигомеров могут формировать канонические антипараллельные комплементарные комплексы, способные служить эффективными субстратами таких, например, ферментов нуклеинового обмена, как Т4-ДНК-лигаза. Исследована возможность энзиматического лигирования синтезированных олигомеров в составе различных комплементарных комплексов для получения ДНК-подобных полимеров с регулярно чередующимися протяженными природными и неприродными участками, а также для синтеза циклических структур.

В последнее время модифицированные олигонуклеотиды * находят все большее применение в молекулярной биологии и генетической инженерии в качестве своеобразных инструментов исследования различных клеточных процессов. Так, олигонуклеотиды, несущие те или иные функционально активные группировки, широко используются для зондирования структуры нуклеиновых кислот, белков нуклеинового обмена, нуклеопротеидных комплексов. В литературе описан широкий спектр модификаций, вводимых в олигонуклеотиды непосредственно в процессе их химического синтеза или же постсинтетически. При этом природа вводимой модифицирующей группировки в каждом конкретном случае опреде-

* Префикс «d» (дезокси) для краткости опущен. Использованные сокращения: ПЭГ600 — полиэтиленгликоль 600; п. о. — пары оснований; $\overset{32}{P}$ — [32 P]фосфат.

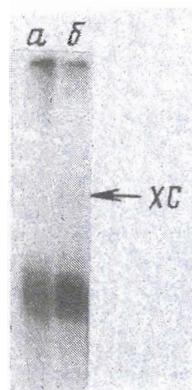


ляется решаемой молекулярно-биологической задачей. На наш взгляд, подход, основанный на моделировании природных ДНК модифицированными синтетическими олигонуклеотидами, может оказаться весьма плодотворным и в исследовании одного из важнейших клеточных процессов — транскрипции, в частности при изучении стадии узнавания РНК-полимеразой промоторного участка.

По современным представлениям, в наиболее общем виде структура прокариотического промотора, узнаваемого РНК-полимеразой *E. coli*, может быть представлена в виде двух консенсусных элементов: TATAATG (последовательность Прибноу) и TTGACA (последовательность Шаллера — Гилберта), разделенных оптимальным расстоянием (спейсером) длиной 17 п. о. [1, 2]. Влияние первичной структуры спейсера на функционирование промотора недостаточно изучено. Отсутствие ярко выраженного сходства в этой области для большинства регуляторных участков позволяет предположить, что спейсер скорее всего обеспечивает лишь необходимое взаимное пространственное расположение двух консервативных последовательностей и, по всей видимости, структура его может широко варьировать [3].

Ранее для изучения механизма инициации транскрипции нами в качестве модельных соединений были предложены ДНК-подобные полимеры с повторяющимися элементами прокариотических промоторов [4]. В частности, было показано, что ДНК-дуплексы, содержащие повторы «идеальной» или «малоиспорченной» последовательности Прибноу, образуют с ферментом РНК-полимеразой *E. coli* достаточно прочные бинарные комплексы [5], так что такие соединения можно рассматривать как потенциальные конкурентные ингибиторы процесса транскрипции *in vitro* и *in vivo*. В продолжение начатых исследований в настоящей работе с целью изучения функциональной роли спейсерной области нами была получена новая серия модельных соединений — смешанные ДНК-подобные полимеры с повторами консенсусных элементов промоторов, разделенных протяженными нунуклеотидными спейсерами, которые в максимально вытянутой конформации приближаются по длине к 17-звенному олигонуклеотиду. Предполагается, что такие искусственные конструкции, отвечающие «минимальным» требованиям к структуре промоторов — два домена, расположенные на фиксированном расстоянии друг от друга, — возможно, способны достаточно эффективно и специфически взаимодействовать с РНК-полимеразой.

Рис. 1. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% ПААГ 5'-³²P-меченых соединений: рIv (а), рIn (б), ХС — здесь и далее положение красителя-маркера ксиленицианола

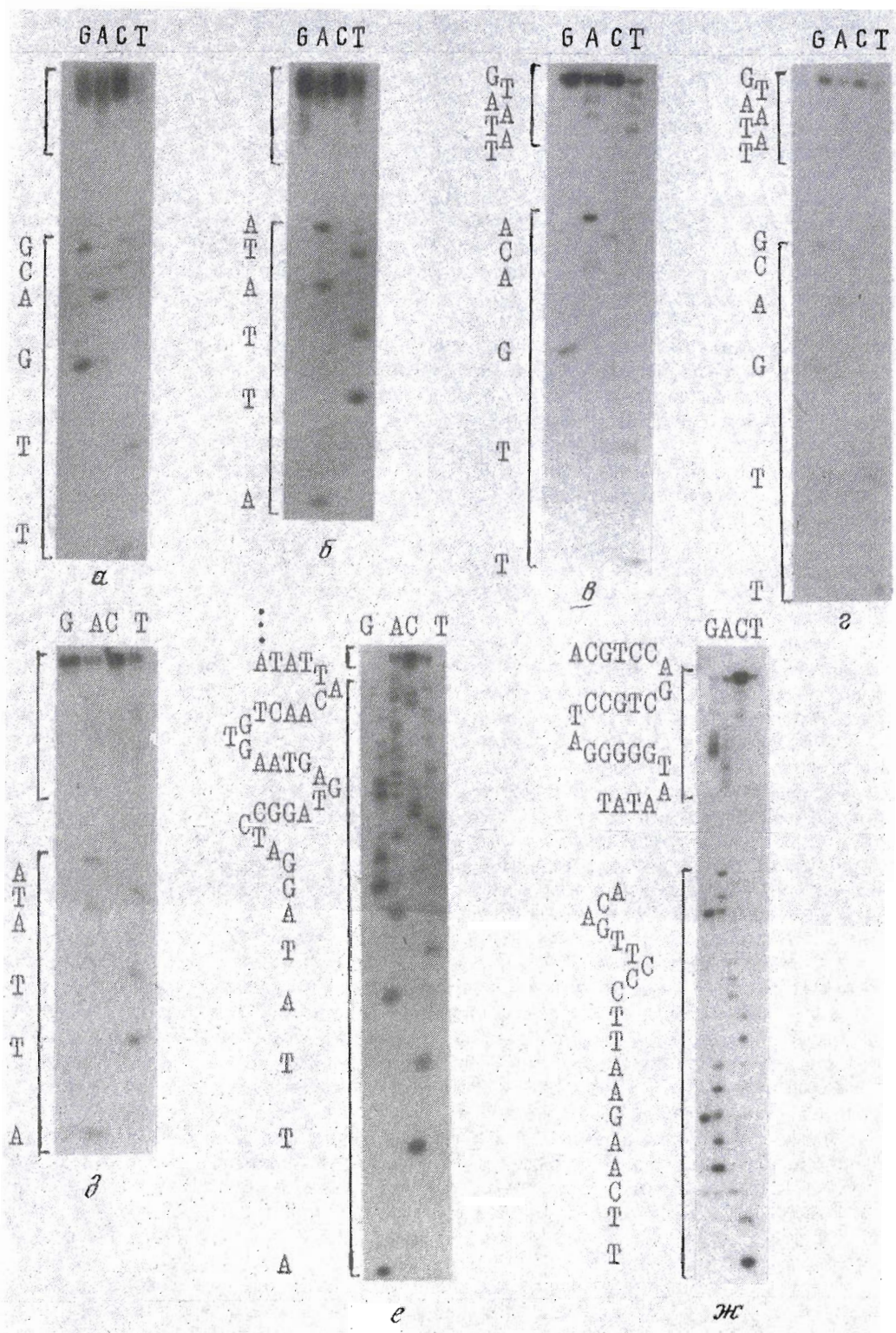


Для конструирования указанных выше моделей в качестве базовых блоков нами были использованы структуры, приведенные на схеме 1. Соединения (Iv), (IIv) и (IIIv) можно рассматривать как аналоги нематричной цепи, а (In) — матричной цепи обобщенного промотора. В случае соединения (IIv) олигонуклеотидные домены точно соответствуют по структуре консенсусным элементам в области —35-го нуклеотида (TTGACA) и —10-го нуклеотида (TATAATG), а в случае соединений (Iv), (In) и (IIIv) имеется одна замена в наименее консервативной 6-й позиции «—35-го» гексануклеотида. Опираясь на данные литературы по промоторным мутациям [6], мы предположили, что такая замена не должна существенно повлиять на функциональные свойства этого домена, но может значительно повысить термостабильность дуплексов, образуемых этим коротким 6-звенным участком.

Наиболее рациональный способ получения подобного рода смешанных олигомеров — прямой химический синтез с использованием соответствующих амидофосфитных дезоксирибонуклеозидных синтонов и аналогичных производных на основе нуклеотидных диолов. Для конструирования нуклеотидных спейсеров необходимого размера при твердофазном синтезе предложенных конструкций нами были выбраны в качестве синтонов амидофосфитные производные диметокситритилированных ПЭГ600 (соединения (Iv) и (In)), тетраэтиленгликоля (IIv) и 1,12-додекандиола (IIIv). Включение в олигонуклеотидную цепь соответственно двух, восьми или семи указанных мономеров должно было имитировать 17-звенный олигонуклеотидный участок. Приготовление амидофосфитных производных осуществляли по стандартным методикам [7]. Последующую сборку соединений (Iv), (In), (IIv) и (IIIv), а также 30-звенных олигонуклеотидов природной структуры (IVv) и (IVn), соответствующих обобщенному прокариотическому промотору, у которого область между двумя консервативными участками в значительной мере подобна (с некоторыми заменами) спейсеру сильного *lac*-промотора [8], проводили на синтезаторе «Applied Biosystems 380В» в автоматическом режиме на всех стадиях, за исключением присоединения нуклеотидных синтонов, которое вели вручную.

После синтеза и удаления N- и Р-защитных групп диметокситритилсодержащие смешанные олигомеры и олигонуклеотиды природной структуры выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ, а после удаления диметокситритильной группы окончательно их очистку осуществляли электрофорезом в денатурирующем ПААГ. Следует отметить, что соединение (IIIv), имеющее протяженные гидрофобные алифатические группировки, при ВЭЖХ необратимо сорбировалось на колонке,

Рис. 2. Секвенирование методом Максама — Гилберта 5'-³²P-меченых базовых соединений рIv (а), рIn (б), рIIv (в) и рIIIv (г); сополимеров рIn—Iv (д) и рIVn—Iv (е); составного смешанного олигомера рVIII—IIv—IX (ж). Квадратными скобками указаны кластеры продуктов расщепления: «верхние» — содержащие нуклеотидные участки; «нижние» — не содержащие нуклеотидных участков. Сбоку указаны читаемые последовательности нуклеотидов



поэтому его очистку осуществляли только электрофорезом в ПААГ. Это соединение сильно сорбировалось также на поверхности стеклянной и пластиковой посуды и на полиакриламидном геле. Кроме того, его высокая гидрофобность не позволяла использовать для концентрирования стандартную процедуру осаждения этанолом. Все это сильно осложнило работу с ним и ограничило ее секвенированием.

Негомогенность спейсерного участка в случае соединений (Iв) и (Iн) («ПЭГ600» — это гетерогенный набор олигомеров $\text{HO}[-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}-]_{11-16}\text{H}$) проявлялась наличием кластера близко расположенных пиков на хроматограмме при анализе выделенных препаратов обращенно-фазовой ВЭЖХ, а также размытостью соответствующих зон при электрофорезе в ПААГ (рис. 1). Подвижность соединений (Iв), (Iн), (IIв) и (IIIв) приблизительно соответствовала подвижности природного 18-звенного олигонуклеотида. Структуру их подтверждали методом Максама — Гилберта [9] (рис. 2а—г), причем наличие протяженной ненуклеотидной вставки во всех случаях проявлялось на радиоавтографе в виде значительного пробела между двумя кластерами (верхним и нижним) радиоактивных зон, соответствующих продуктам расщепления двух олигонуклеотидных участков после обработки модифицирующими реагентами. При этом у соединений (IIв) и (IIIв) хорошо читаются как 5'-, так и 3'-концевые олигонуклеотидные участки, в то время как в случае соединений (Iв) и (Iн) с гетерогенными спейсерами читаются только олигонуклеотидные участки, ближайшие к меченному радиоизотопом 5'-концу.

Такие смешанные олигомеры получены нами впервые, хотя синтез аналогичного рода соединений с меньшей по размеру гибкой ненуклеотидной ножкой на основе других мономеров алифатического ряда в литературе описан [10, 11]. Свойства этих соединений и их поведение в различных химических и биохимических процессах практически не изучены. В первую очередь необходимо было выяснить, способны ли они за счет олигонуклеотидных участков формировать между собой, а также с природными олигонуклеотидами нормальные антипараллельные ДНК-подобные двухцепочечные комплексы, у которых напротив ненуклеотидного спейсера в противоположной цепи расположен либо природный фрагмент ДНК, либо ненуклеотидный участок.

Исследование комплексообразования в системах с участием соединений подобного типа представляет собой самостоятельную и довольно сложную задачу. Однако достаточно надежные данные о самом факте формирования комплементарных комплексов можно получить с помощью некоторых простых энзиматических тестов. В частности, в качестве индикатора на формирование канонических ДНК-дуплексов можно использовать Т4-ДНК-лигазу, субстратами которой являются только реально существующие в растворе достаточно протяженные [12, 13] фрагменты двуцепочечных ДНК. В связи с этим нами была изучена возможность катализируемого Т4-ДНК-лигазой соединения олигонуклеотидных частей смешанных олигомеров как тупыми концами (путем прямой стыковки образуемых ими дуплексов), так и с использованием дополнительных комплементарных им олигонуклеотидов природной структуры в качестве матриц. В этих экспериментах соединения (Iв), (Iн), (IIв), (IVв) и (IVн) использовали в 5'-фосфорилированном виде — (pIв), (pIн), (pIIв), (pIVв) и (pIVн).

Лигирование тупыми концами изучалось в системах двух типов, в которых либо обе цепи дуплекса формировались с участием модифицированных олигомеров (схема 1, система (Iв) + (Iн)), либо одна цепь («верхняя» — (Iв) и (IIв) или «нижняя» — (Iн)) содержала ненуклеотидный спейсер, а другая, комплементарная ей в концевых участках, представляла собой один из двух контрольных 30-звенных олигонуклеотидов ((IVн) или (IVв) соответственно). Нетрудно видеть (схема 1), что при комплементационных взаимодействиях полученные нами смешанные олигомеры должны формировать два спаренных участка длиной в 6 и 7 п. о., фланкированных неприродными фрагментами. Известно, что Т4-ДНК-лигаза не способна лигировать тупыми концами свободно существующие в растворе дуплексы размером меньше 7 п. о. [14]. Можно было ожидать, что в случае формирования

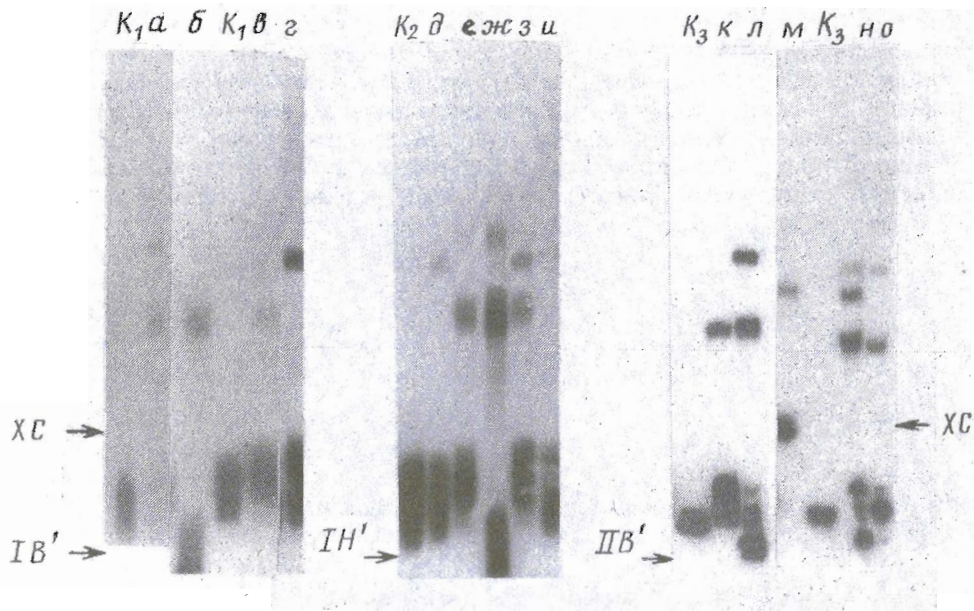


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% ПААГ продуктов Т4-ДНК-лигазных реакций в системах (в скобках даны мольные соотношения нуклеотидных компонентов); P^* — $[^{32}\text{P}]$ фосфат: a — $\text{rIv} + \text{rIn}$ (1 : 1); b — $\text{rIv} + \text{V}$ (1 : 1,5); v — $\text{rIv} + \text{rIVn}$ (1 : 1); z — $\text{rIv} + \text{IVn}$ (1 : 1); d — $\text{rIn} + \text{IVv}$ (1 : 1); e — $\text{rIn} + \text{rIv}$ (1 : 1); $ж$ — $\text{rIn} + \text{VI}$ (1 : 1,5); $з$ — $\text{rIn} + \text{rIVv}$ (1 : 1); $и$ — $\text{rIn} + \text{rIVn} + \text{VI}$ (1 : 1 : 2); $к$ — $\text{rIv} + \text{IIv} + \text{VII}$ (1 : 2 : 3); $л$ — $\text{rIv} + \text{VII}$ (1 : 1,5); $м$ — $\text{rIVn} + \text{IIv}$ (1 : 1); $н$ — $\text{rIv} + \text{rIVv}$ (1 : 1); $о$ — $\text{rIv} + \text{rIVv} + \text{VII}$ (1 : 1 : 2). K_1 , K_2 , K_3 — исходные соединения rIv , rIn , rIv соответственно. Стрелками указаны положения соединений $(Iv)'$, $(In)'$ и $(Iv)'$ с аномальной электрофоретической подвижностью

смешанными олигомерами (Iv) и (In) двутяжевых комплексов при лигировании будет образовываться только димер за счет соединения 7-звенных доменов. Обработку Т4-ДНК-лигазой эквимольной смеси $(\text{rIv} + \text{rIn})$ проводили в условиях, благоприятствующих формированию ДНК-дуплексов: при высокой концентрации олигонуклеотидных фрагментов (10^{-5} М) и максимально пониженной температуре ($<4^\circ \text{C}$). Перед добавлением фермента реакционную смесь длительно отжигали: $20 \rightarrow 65^\circ \text{C}$ (5 мин) + $65 \rightarrow 0^\circ \text{C}$ (12 ч). Оказалось, что в этих условиях появлялись продукты лигирования со степенью полимеризации $n = 2-5$, причем картина распределения продуктов полимеризации по длинам не зависела от того, в какой из цепей, верхней или нижней, находилась ^{32}P -метка (рис. 3а, е). Все это доказывало как сам факт формирования олигомерами канонических дуплексов, так и то, что в составе подобных конструкций 6-звенные дуплексные участки могут служить субстратами Т4-ДНК-лигазы. Чтобы подтвердить это, мы обработали Т4-ДНК-лигазой эквимольную смесь $(\text{rIv} + \text{In})$, что приводило к образованию симметричного димерного продукта. Лигирование в этом случае могло идти только путем соединения 5'-фосфатных и 3'-гидроксигрупп 6-звенных доменов. Структура полученного димера была доказана секвенированием (рис. 2д).

Лигирование тупыми концами комплексов второго типа (системы $(\text{rIv} + \text{rIVn})$, $(\text{rIv} + \text{IVn})$, $(\text{rIn} + \text{IVv})$, $(\text{In} + \text{rIVv})$, $(\text{IIv} + \text{rIVn})$ (схема 2)), у которых ненуклеотидный спейсер расположен напротив природного 17-звенного спейсера контрольного 30-звенного олигонуклеотида, проводили в тех же условиях. Оказалось, что Т4-ДНК-лигаза также способна использовать в качестве субстратов такие составные дуплексы (рис. 3в, г, д, з, м, н), причем характер распределения продуктов реакции по длинам свидетельствует о включении модифицированных соединений как в одну растущую цепь, так и в обе цепи. Образуются как гомополимеры модифицированных блоков, так и их сополимеры с 30-звенными

форетическая подвижность которых в 20% ПААГ была немного больше подвижности исходных смешанных олигомеров (рис. 3, зоны Iв', Iн' и IIв'). При проведении реакции матричной полимеризации в присутствии избытка нефосфорилированных смешанных олигомеров (системы (Iв + pIв + V), (Iн + pIн + VI) и (IIв + pIIв + VII)) основными продуктами полимеризации становились димеры (см., например, рис. 3к), а доля более подвижных веществ резко снижалась.

Известно, что в подобных системах на основе олигонуклеотидов природной структуры принципиально возможно протекание и внутримолекулярной конденсации с образованием циклических соединений [15, 16]. Мы предположили, что продукт реакции с аномально высокой электрофоретической подвижностью как раз и является таким циклом. Для проверки этой гипотезы были проведены дополнительные эксперименты.

Ранее было показано [7, 17], что фосфодиэстераза змеиного яда способна вести гидролиз олигонуклеотидов с короткими ненуклеотидными вставками до смеси 5'-моонуклеотидов и соединения $pNpX$, где X — ненуклеотидная вставка: фермент как бы проскакивает модификацию, не расщепляя межнуклеотидную связь с 5'-конца от модифицированного звена. Результаты гидролиза полученных в настоящей работе неприродных соединений также свидетельствуют о том, что фосфодиэстераза змеиного яда способна полностью гидролизовать олигонуклеотидные домены, фланкированные различными протяженными олигомерами ненуклеотидной природы: на радиоавтографе электрофореза гидролизатов присутствуют радиоактивные зоны с высокими («моонуклеотидными») электрофоретическими подвижностями (рис. 4). Однако гидролизуются смешанные олигомеры существенно медленнее своих природных аналогов: при анализе не доведенных до конца гидролизатов (см., например, рис. 4ж, з) хорошо видно, что гидролиз резко замедляется в районе неприродной вставки. Полученные данные означают, что и в том случае, когда модифицирующие группировки довольно велики и даже сравнимы по размеру с олигонуклеотидными доменами смешанных олигомеров, фермент не блокируется ими полностью и сохраняет способность катализировать отщепление неприродного участка. Таким образом, было показано, что исходные смешанные олигомеры (Iв), (Iн) и (IIв) и их линейные гомодимеры $(pIв)_2$, $(pIн)_2$ и $(pIIв)_2$ полностью гидролизуются фосфодиэстеразой змеиного яда.

В противоположность линейным смешанным олиго- и полимерам продукты конденсации с повышенной электрофоретической подвижностью в тех же условиях оказались устойчивы к действию фосфодиэстеразы змеиного яда (рис. 4в, г). Кроме того, щелочная фосфатаза не удаляет из этих соединений ^{32}P -метку, введившуюся в 5'-конец исходного смешанного олигомера.

Далее, если соединения (Iв'), (Iн') и (IIв') имеют циклическую структуру, то обработка их по методу Максама — Гилберта с расщеплением олигонуклеотидных фрагментов только в одном месте должна в любом случае приводить к образованию линейных 5',3'-дифосфорилированных продуктов, укороченных по сравнению с исходными смешанными олигомерами (Iв), (Iн) и (IIв) только на одно нуклеотидное звено. Такое расщепление легко получить у (Iн') при реакции по «Г» (рис. 5а, д) и у (IIв') при реакции по «С» (рис. 5в, е). Аналогичная обработка линейных соединений $(pIн)$ и $(pIIв)$ приводит к образованию 5',3'-дифосфорилированных продуктов, укороченных на несколько нуклеотидных звеньев (рис. 5б, г).

Результаты этих анализов вместе с остальными приведенными выше данными позволяют идентифицировать обнаруженные нами продукты Т4-ДНК-лигазной реакции (Iв'), (Iн') и (IIв') с аномальными электрофоретическими подвижностями как циклические мономеры исходных смешанных олигомеров.

Следует отметить, что электрофоретическая подвижность циклических соединений (Iв'), (Iн') и (IIв') относительно их линейных аналогов сильно зависят от концентраций ПААГ. Так, в 20% ПААГ соединения (Iн') и (IIв') перемещаются медленнее (рис. 5а, в) продуктов их расщепления по «Г» или «С». Напротив,

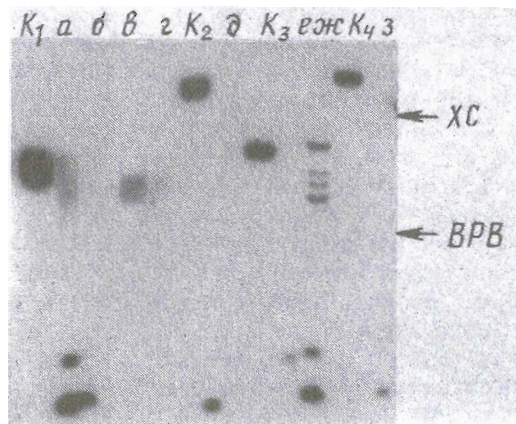


Рис. 4. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% ПААГ продуктов гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда соединений: P^{32}Iv (а), P^{32}In (б), $\text{P}^{32}\text{Iv}'$ (в), $\text{P}^{32}\text{In}'$ (г), $\text{P}^{32}\text{Iv}''$ (д), $\text{P}^{32}\text{In}''$ (е, ж) и сополимера $\text{P}^{32}\text{Iv}-\text{Iv}$ (з). K_1, K_2, K_3, K_4 — исходные соединения $\text{P}^{32}\text{Iv}, \text{P}^{32}\text{Iv}'', \text{P}^{32}\text{In}$ и $\text{P}^{32}\text{Iv}-\text{Iv}$ соответственно. ВРВ — положение красителя-маркера бромфенолового синего

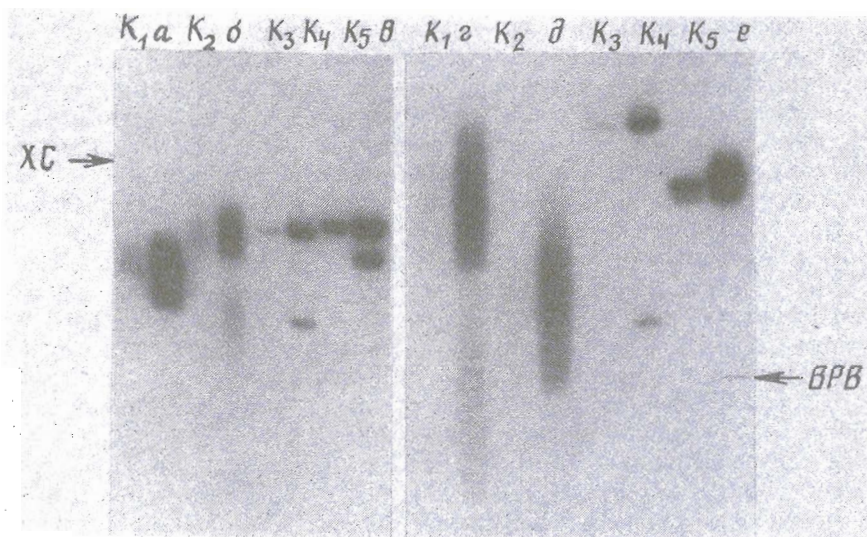


Рис. 5. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% (а—б) и 15% (г—е) ПААГ продуктов расщепления $\text{P}^{32}\text{In}'$ (а, д) и P^{32}In (б, г) по «С» и $\text{P}^{32}\text{In}'$ (в, е) по «С» (см. текст). K_1, K_2, K_3 и K_5 — исходные соединения $\text{P}^{32}\text{In}', \text{P}^{32}\text{In}, \text{P}^{32}\text{In}'$ и $\text{P}^{32}\text{In}'$ соответственно; K_4 — контрольная смесь P^{32}In и 13-звенного маркера длины P^{32}V

в 15% ПААГ подвижности (In') и (In'') практически совпадают со скоростями передвижения тех же продуктов расщепления (рис. 5д, е). Такое необычное явление, как инверсия относительных электрофоретических подвижностей при изменении концентрации ПААГ, ранее уже наблюдалось, например, у неприродных олигонуклеотидов, модифицированных пирофосфатными межнуклеотидными связями [18].

При совместном лигировании смешанных олигомеров и контрольных 30-звенных олигонуклеотидов (см. схему 1) на тех же 13-звенных матрицах образуются

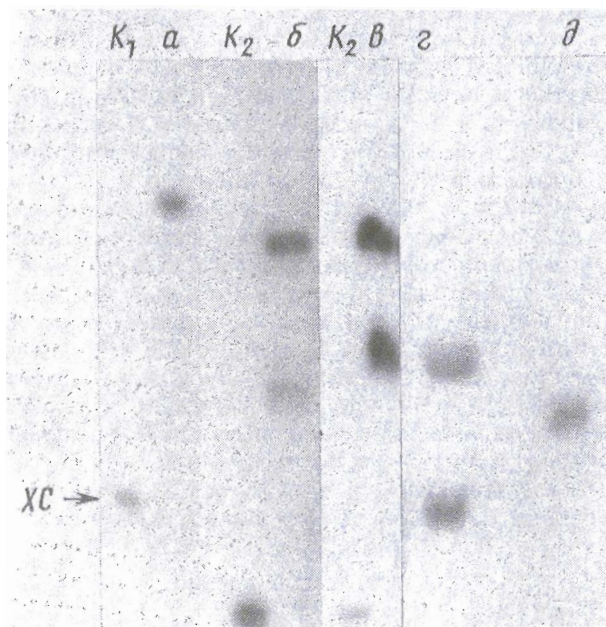


Рис. 6. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 15% ПААГ продуктов Т4-ДНК-лигазных реакций в системах (в скобках даны молярные соотношения нуклеотидных компонентов): а — $\text{pIVv} + \text{pIX} + \text{VIII} + \text{XI} + \text{XII}$ (1 : 1 : 1 : 1,5 : 1,5); б — $\text{pIv} + \text{pIX} + \text{VIII} + \text{XI} + \text{XII}$ (1 : 1 : 1 : 1,5 : 1,5); в — $\text{pIIv} + \text{pIX} + \text{VIII} + \text{XI} + \text{XII}$ (1 : 1 : 1 : 1,5 : 1,5); г — $\text{pIVn} + \text{pX} + \text{XIII}$ (1 : 1 : 1,5); д — $\text{pIn} + \text{pX} + \text{XIII}$ (1 : 1 : 1,5). K_1, K_2, K_3 — исходные соединения $\text{pIVv}, \text{pIv}, \text{pIIv}$ соответственно

вались одноцепочечные сополимеры. На рис. 3и, о приведены результаты энзиматической конденсации в системах $(\text{pIn} + \text{pIVn} + \text{VI})$ и $(\text{pIIV} + \text{pIVv} + \text{VII})$. Структура одного из продуктов реакций — сополимера $(\text{pIVn}-\text{In})$ — приведена на рис. 2е.

Помимо реакции полимеризации смешанных олигомеров (Iv), (In) и (IIv) нами была исследована возможность удлинения входящих в их состав олигонуклеотидных участков с помощью Т4-ДНК-лигазы. В частности, на матрицах (XI), (XII) и (XIII) к смешанным олигомерам присоединяли олигонуклеотиды (VIII), (IX) и (X) (схема 4), соответствующие по структуре полилинкерной области

Схема 4



промоторестирующей плазмиды рHD-011-14-11 [19]. Все реакции лигирования в дуплексах с участием смешанных олигомеров (рис. 6) протекали практически с той же эффективностью, что и в системах, не содержащих неприродных фрагментов. Структуры продуктов лигирования в подобных системах были подтверждены секвенированием по Максаму — Гилберту (см., например, рис. 2ж).

Таким образом, в настоящей работе химико-энзиматическим путем получены наборы ДНК-подобных соединений, содержащих в своем составе различные протяженные нуклеотидные участки. Показано, что олигонуклеотидные фрагменты смешанных олиго- и полимеров в водных растворах способны формировать канонические антипараллельные двутяжевые комплементарные комплексы, которые Т4-ДНК-лигаза достаточно эффективно использует как субстраты в реакциях соединения тупыми или липкими концами с получением линейных полимеров и циклических структур. Полученные данные позволяют заключить, что при необходимости ввести сложный неприродный участок в состав протяженных фрагментов ДНК достаточно синтетическим путем фланкировать его олигонуклеотидными доменами минимальной длины (5—6 нуклеотидов), а затем провести стандартную энзиматическую сборку всей конструкции с помощью Т4-ДНК-лигазы. В настоящее время исследуется взаимодействие описанных в данной работе соединений с рядом других ферментов нуклеинового обмена.

Экспериментальная часть

В работе использованы 3'-(N,N-диизопропиламида)-β-цианэтилфосфиты 5'-О-диметокситритил-2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США), N-метил-имидазол, N,N-диизопропилэтиламин (Fluka, Швейцария), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (BDH, Англия), трис, EDTA, дитиотреит, MgCl₂ (Merck, Германия), ПЭГ600, тетразол, (N,N-диизопропиламида)-β-цианэтилхлорфосфит, АТР (Sigma, США), додекандиол (Aldrich, США), тетраэтиленгликоль марки х. ч. (Союзхимреактив, Россия), [γ -³²P]АТР (1000 Ки/ммоль) (Изотоп, Обнинск, Россия).

Ферменты: полинуклеотидкиназа фага Т4 (КФ 2.7.1.78, 2,4 ед. акт./мкл), ДНК-лигаза фага Т4 (КФ 6.5.1.1, 8 ед. акт./мкл) — производства МБИ «Ферментас» (Литва); фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1) от «Worthington Biochemical Corp.» (США).

ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах хлороформ — этанол, 95 : 5 и 9 : 1. Колонную жидкостную хроматографию проводили на силикагеле «Silicagel L40/100» (Chemapol, Чехо-Словакия).

Синтез 1-О-(4,4'-диметокситритил)-1,12-додекандиола был осуществлен по методу [7]. К 1,21 г (6 ммоль) 1,12-додекандиола в 10 мл сухого пиридина добавляли 0,41 г (1,2 ммоль) диметокситритилхлорида и смесь выдерживали 2 ч при 20° С. Реакцию останавливали добавлением воды (10 мл), тритилсодержащие соединения извлекали экстракцией хлороформом (2×30 мл) и целевое вещество выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в хлороформе с выходом 87%.

Синтез О-(4,4'-диметокситритил)тетраэтиленгликоля осуществляли аналогично из 2 г (10,3 ммоль) тетраэтиленгликоля и 1,52 г (4,5 ммоль) диметокситритилхлорида в 50 мл сухого пиридина (5 ч при 20° С). После хроматографии в системе хлороформ — метанол (ступенчатый градиент метанола 0—5%) выход составил 50% по отношению к диметокситритилхлориду.

Синтез О-(4,4'-диметокситритил)полиэтиленгликоля вели аналогично, исходя из 0,6 г (1 ммоль) ПЭГ600.

Синтез [1-О-(4,4'-диметокситритил)-12-О-[(N,N-диизопропиламида)метилфосфит]-1,12-додекандиола проводили по аналогии с методикой, приведенной в работе [7]. К 0,505 г (1 ммоль) диметокситритилдодекандиола в 5 мл сухого хлористого метилена добавляли 86 мг диизопропиламинтетразолида и 326 мкл бис(диизопропиламида)метилфосфита, смесь выдерживали 1 ч при 20° С, выливали в 50 мл хлористого метилена и экстрагировали насыщ. NaHCO₃ (1×20 мл) и насыщ. NaCl (2×20 мл). Органический слой высушивали сульфатом натрия и

полученное амидофосфитное производное додекандиола использовали в твердофазном синтезе без дополнительной очистки.

(*N,N*-Диизопропиламидо)метилфосфит *O*-(4,4'-диметокситритил)полиэтиленгликоля получали аналогично исходя из 1 г (1,1 ммоль) ПЭГ600.

Синтез (*N,N*-диизопропиламидо)- β -цианэтилфосфита *O*-(4,4'-диметокситритил)тетраэтиленгликоля осуществляли по методу [7]. К раствору 0,5 г (1 ммоль) диметокситритилтетраэтиленгликоля и 0,8 мл (4,6 ммоль) диизопропилэтиламина в 3 мл сухого хлористого метилена добавляли 0,476 мл (2 ммоль) *N,N*-диизопропиламидо- β -цианэтилхлорфосфита и смесь выдерживали 30 мин при 20° С. Реакционную смесь разбавляли 30 мл этилацетата, промывали насыщен. NaCl (2×20 мл), органический слой высушивали сульфатом натрия и полученное амидофосфитное производное использовали в твердофазном синтезе без дополнительной очистки.

Синтез олигонуклеотидов природной структуры и модифицированных выполняли на синтезаторе Applied Biosystems 380В (США) в автоматическом и полуавтоматическом режиме.

Защитные группы после синтеза олигомеров удаляли по стандартным методам обработкой тиофенолом, конц. NH₄OH или 80% уксусной кислотой.

Анализ реакционных смесей после синтеза и выделение целевых олигомеров осуществляли ВЭЖХ на хроматографе Tracor (Нидерланды) с использованием колонок (4×250 мм) с носителем Диасорб С16Т (7 мкм, «Элсико», Россия). Обращенно-фазовую хроматографию соединений с диметокситритильной группой вели при 45° С в градиенте концентраций ацетонитрила 0—40% в 0,1 М ацетате аммония с рН 6,5. После удаления диметокситритильной группы целевые олигомеры анализировали повторно обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Введение ³²P-метки и препаративное 5'-фосфорилирование смешанных олигомеров и олигонуклеотидов природной структуры осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и АТФ по методике работы [4].

Ферментативное лигирование олигонуклеотидсодержащих соединений проводили в 10 мкл инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ АТФ, 0,02 ммоль/л каждого олигомера и 8 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы, в течение 12—18 ч при 0°С (системы (pIv + pIn), (pIv + In)), 4° С (системы (pIv + V), (pIn + VI), (pIv + VII), (pIv + pIVn), (pIn + pIVv), (pIv + pIVn), (pIv + IVn), (pIn + IVv), (pIn + pIVn + VI), (pIv + pIVv + VII)) и 8° С ((VIII + pIv + pIX + XI + XII), (VIII + pIv + pIX + XI + XII), (pVIII + pIVv + pIX + XI + XII), (pIn + X + XIII), (pIVn + X + XIII)). Реакцию останавливали добавлением раствора EDTA до конечной концентрации 20 мМ. После высушивания и добавления красителей-маркеров реакционную смесь разделяли электрофорезом в 15 и 20% денатурирующем ПААГ (0,08 М трис-боратный буфер, рН 8,3, 7 М мочевины; пластины 200×200×0,4 мм; напряженность поля 50 В/см).

Гидролиз смешанных олигомеров и олигонуклеотидов природной структуры (0,01—0,05 ОЕ₂₆₀) фосфодиэстеразой змеиного яда (0,5—2 ед. акт.) проводили в 10 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl, рН 9,0, и 0,02 М MgCl₂, при 37° С в течение 3 и 5 ч (в случае IIv).

Секвенирование полученных в работе олигонуклеотидов и олигонуклеотидных участков смешанных олигомеров методом Максама — Гилберта проводили с использованием модификаций: по «G» — диметилсульфатом [9], по «A» — диэтилпирокарбонатом [20], по «T» — перманганатом калия [21], по «C» — гидроксил-аминдм [22]; 1 М водный гидроксил-амин с рН 7, 20° С, 0,5 ч.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosenberg M., Court D.//Annu. Rev. Biochem. 1979. V. 13. P. 319—353.
2. Harley C. B., Reynolds R. P.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 5. P. 2343—2361.
3. Aoyama T., Takanami M., Ohtsuka E., Taniyama Y., Marumoto R., Sato H., Ikehara M.//Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 17. P. 5855—5864.

4. Королева О. Н., Друца В. Л., Долинная Н. Г., Цытович А. В., Шабарова З. А.//Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 1. С. 146—161.
5. Королева О. Н., Друца В. Л., Шабарова З. А.//Биополимеры и клетка. 1988. Т. 4. № 1. С. 7—14.
6. Kobayashi M., Nagata K., Ishihata A.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 24. P. 7367—7372.
7. Seela F., Kaiser K.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 7. P. 3113—3129.
8. de Boer A., Comstock L. J., Vasser M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 1. P. 21—25.
9. Maxam A., Gilbert W.//Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
10. Richardson P. L., Schepartz A.//J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 13. P. 5109—5111.
11. Cload S. T., Schepartz A.//J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 16. P. 6324—6326.
12. Королева О. Н., Друца В. Л.//Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. № 6. С. 1632—1641.
13. Шилов И. А., Королева О. Н., Друца В. Л.//Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. № 3. С. 647—654.
14. Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Чувпило С. А.//Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1522—1535.
15. Carobianco M. L., Saccurio A., Tondelli L., Gartesi A., Bonora G. M.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 9. P. 2661—2669.
16. Prakash G., Kool E. T.//J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1991. № 17. P. 1161—1163.
17. Wilk A., Koziolkiewicz M., Grajkowski A., Uznanski B., Stec W. J.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 8. P. 2065—2068.
18. Пурмаль А. А., Друца В. Л., Шабарова З. А.//Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 394—400.
19. Королева О. Н., Друца В. Л.//FEBS Lett. 1991. V. 278. № 2. P. 207—210.
20. Друца В. Л., Кривонос А. В., Королева О. Н., Шабарова З. А.//Биоорган. химия. 1984. Т. 16. № 8. С. 1052—1059.
21. Rubin C. M., Schmid C. W.//Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 20. P. 4613—4619.
22. Kochetkov N. K., Budovsky E. I., Demushkin V. P., Turchinsky M. F., Simukova N. A., Sverdlov E. D.//Biochim. et biophys. acta. 1967. V. 142. № 1. P. 35—46.

Поступила в редакцию
22.VI.1993

O. N. Koroleva, E. M. Volkov, V. L. Drutsa

THE CONSTRUCTION OF MIXED POLYMERS CONSISTING OF DNA FRAGMENTS WITH CONSENSUS PROMOTER ELEMENTS AND NONNUCLEOTIDE SPACERS

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

Mixed oligomers, representing oligonucleotides connected with long nonnucleotide spacers, have been synthesized using phosphoramidite chemistry. The oligonucleotide moieties of the mixed oligomers fully or partially correspond in the structure to the consensus elements of —35 (TTGACA) and —10 (TATAATG) regions of prokaryotic promoters. The nonnucleotide spacers, approximating in size 17-membered DNA fragments, were synthesized using phosphoramidite derivatives of polyethylene glycol (PEG600), tetraethylene glycol or dodecanediol. It is shown that the oligonucleotide moieties of the mixed oligomers can form «normal» DNA like antiparallel complementary complexes, being the substrates of T4 DNA ligase. To obtain the DNA-like polymers with alternating natural and nonnatural regions or cyclic structures, the enzymatic ligation of different complexes of the oligomers synthesized was studied.