



УДК 547.963.32.057:542.95

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ДНК-ДУПЛЕКСОВ С КОВАЛЕНТНЫМИ СВЯЗЯМИ МЕЖДУ ТЯЖАМИ

© 1996 г. С. И. Анцыпович, Т. С. Орецкая[#], Е. А. Романова,
Е. М. Волков, В. Н. Ташлицкий, М. Вассер*, З. А. Шабарова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы;

* Корпорация "Genset", Париж

Поступила в редакцию 10.10.95 г.

Описан синтез серии модифицированных ДНК-дуплексов с поперечными ковалентными связями между тяжами. Строение синтезированных соединений подтверждено анализом продуктов их гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Afl*I. Исследована термическая и гидролитическая устойчивость полученных ковалентно сшитых дуплексов.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды, 2'-амино-2'-дезоксисуридин, ДНК-дуплекс с ковалентно связанными цепями.

Ранее нами была показана возможность образования ковалентной поперечной связи между тяжами в модифицированном дуплексе [1]. Целью данной работы является:

- демонстрация возможностей применения этого метода на наборе олигонуклеотидов различной первичной структуры;
- изучение влияния положения модифицированных звеньев друг относительно друга на эффективность реакции между тяжами дуплекса;
- получение ДНК-дуплексов с двумя ковалентными связями между тяжами.

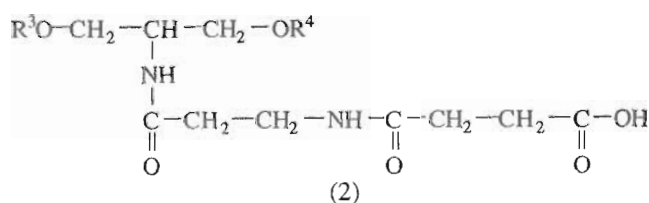
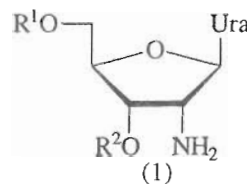
Использование предложенных нами [1, 2] комплементарных модифицированных олигонуклеотидов, один из которых (1) содержит 2'-амино-2'-дезоксисуридин, а другой (2) – ненуклеозидную вставку с локализованной на ней карбоксильной группой, позволяет получать ковалентно сшитые дуплексы различной структуры.

Модифицированные звенья (3) и (4) могут быть введены направленно в любое заранее заданное положение олигонуклеотидной цепи и в

Сокращения: Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; CDI – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; MES – морфолинэтансульфокислота. Префикс "d" (дезоксид) при обозначении 2'-дезоксирибонуклеозидов и олигодезоксирибонуклеотидов опущен. Верхний индекс "cl" использован для обозначения дуплексов с ковалентно сшитыми цепями.

[#] Автор для переписки.

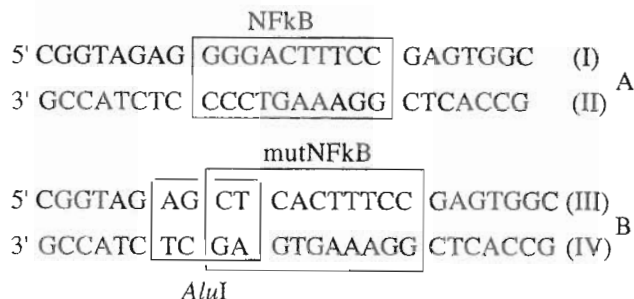
любом количестве. При этом стандартные синтетические процедуры автоматического олигонуклеотидного синтеза сохраняются.



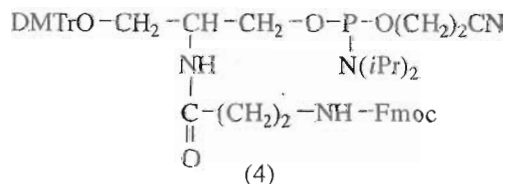
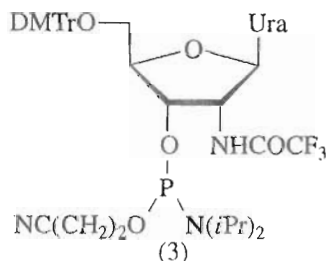
R¹-R⁴ – фрагменты олигонуклеотидных цепей.

Для изучения были выбраны две системы, составленные из 25-звенных олигонуклеотидов (дуплексы А и В). Дуплекс А содержит участок связывания белка NFκB, привлекающего в настоящее время внимание исследователей в связи с важной ролью, которую он играет в регуляции экспрессии генов иммуноглобулинов и в организации иммунного ответа организма [3]. Сшитые дуплексы, термически стабильные и устойчивые к действию экзонуклеаз, могут оказаться удобной ловушкой для ДНК-связывающих белков. Дуплекс В содержит мутированный сайт узнавания

белка NFκB, а также участок узнавания эндонуклеазы рестрикции *AluI*.



С использованием модифицированных синтонов (3) и (4) были получены олигонуклеотиды (V)–(XVIII) (см. таблицу).



Из модифицированных олигонуклеотидов были составлены семь олигонуклеотидных дуплексов (таблица). В одной из цепей каждого дуплекса содержалась аминогруппа, а во второй комплементарной цепи – карбоксильная.

Реакцию между цепями в дуплексах С–J проводили с использованием водорастворимого CDI в качестве конденсирующего агента.

С помощью молекулярного моделирования было показано, что оптимальное взаимное расположение реагирующих групп для образования ковалентной связи достигается при введении модификаций в комплементарные цепи в положение друг напротив друга (дуплексы С–Е, G–J), а также в случае сдвига модификаций друг относительно друга на два нуклеотидных остатка (дуплекс F, см. таблицу).

Реакционные смеси анализировали и целевые продукты выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ион-парный вариант) (см. рис. 1), а также с использованием электрофореза в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины (рис. 2). Степень превращения в реакции между цепями определяли как отношение радиоактивности целевого продукта к суммарной радиоактивности продукта и исходных олигонуклеотидов, а также с помо-

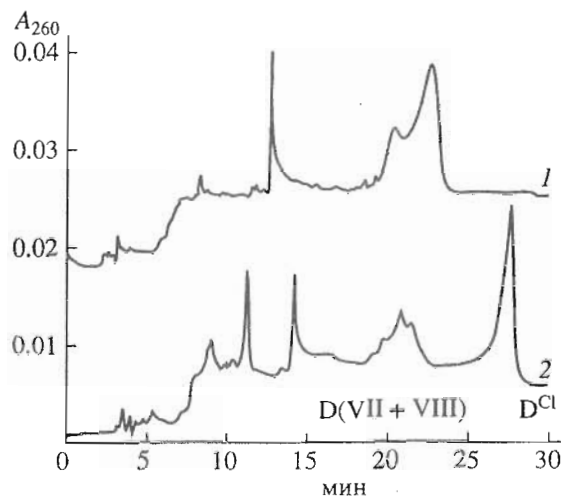


Рис. 1. Сравнение профилей обращенно-фазового ВЭЖХ-анализа (ион-парный вариант) смеси олигонуклеотидов (VII) и (VIII), составляющих дуплекс D (1), и реакционной смеси, полученной в результате реакции между тяжами дуплекса D (2). D – смесь олигонуклеотидов (VII) и (VIII), D^{Cl} – ковалентно сшитый дуплекс.

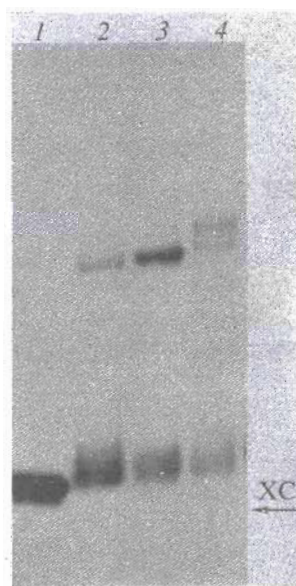


Рис. 2. Радиоавтограф (электрофорез в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины) реакционных смесей, полученных в результате реакции между тяжами в дуплексах G (2), H (3), J (4). 1 – дуплекс B (контроль).

стью ион-парной ВЭЖХ как отношение площади пика, соответствующего сшитому дуплексу, к сумме площадей пиков, соответствующих исходному и конечному соединениям, рассчитанных с использованием программы Maxima (Waters, США). Максимальные выходы сшитых дуплексов для систем С–J приведены в таблице.

Из данных по термической устойчивости сшитых дуплексов С^{Cl}–J^{Cl}, полученных методом

Таблица 1

Обозначение		Исходные дуплексы*		Ковалентно сшитые дуплексы			
Дуплексы	Олигонуклеотиды	5'—————3' 3'—————5'		Т. пл., °С	Обозначение	Выход продукта, %	Т. пл., °С
		A	(I) (II)				
B	(III) (IV)	CGGTAGAGCTCACTTTCCGAGTGGC GCCATCTCGAGTGAAAGGCTCACCG		78	—	—	—
C	(V) (VI)	CGGTAGAGGGGACTTTCCGAN ^c TGGC GCCATCTCCCCTGAAAGGCTU ⁿ ACCG		74	C ^{cl}	52	84
D	(VII) (VIII)	CGGTN ^c GAGGGGACTTTCCGAGTGGC GCCAU ⁿ CTCCCCTGAAAGGCTCACCG		74	D ^{cl}	82	85
E	(IX) (X)	CGGTN ^c GAGGGGACTTTCCGAN ^c TGGC GCCAU ⁿ CTCCCCTGAAAGGCTU ⁿ ACCG		70	E ^{cl}	67	87
F	(XI) (XII)	CGGTAGN ^c GGGGACTTTCCGAGTGGC GCCAU ⁿ CTCCCCTGAAAGGCTCACCG		75	F ^{cl}	84	88
G	(XIII) (XIV)	CGGTAGAGCTCACTTTCCGAN ^c TGGC GCCATCTCGAGTGAAAGGCTU ⁿ ACCG		72	G ^{cl}	40	85
H	(XV) (XVI)	CGGTN ^c GAGCTCACTTTCCGAGTGGC GCCAU ⁿ CTCGAGTGAAAGGCTCACCG		73	H ^{cl}	75	86
J	(XVII) (XVIII)	CGGTN ^c GAGCTCACTTTCCGAN ^c TGGC GCCAU ⁿ CTCGAGTGAAAGGCTU ⁿ ACCG		69	J ^{cl}	62	88

* Uⁿ – 2'-амино-2'-дезоксуридин, N^c – нуклеозидная вставка с карбоксильной группой. Курсивом выделен сайт рестрикции *AluI*.

УФ-спектроскопии (таблица), видно, что для них характерно снижение температуры плавления по сравнению с немодифицированными в среднем на 5–7°C, что связано с дестабилизирующим влиянием введенных модификаций, а также с элиминированием одной G · C-пары в месте введения нуклеозидной вставки. Однако для сшитых дуплексов C^{cl}–J^{cl} значения температуры плавления оказались выше в сравнении не только с модифицированными дуплексами С–J, но и с немодифицированными А и В. Среднее увеличение термической стабильности сшитых дуплексов по сравнению с немодифицированными составило 8°C, а с модифицированными, но несшитыми дуплексами соответствующей первичной структуры – 15°C. Такое повышение температурной стабильности подтверждает наличие сшивок между цепями в полученных дуплексах C^{cl}–J^{cl}.

Устойчивость полученных соединений к действию смеси фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы в условиях исчерпывающего ферментативного гидролиза оказалась существенно повышенной по сравнению с контролями, в качестве которых использовали природные дуплексы и несшитые дуплексы, составленные из модифицированных олигонуклеотидов. В условиях, когда контрольные дуплексы гидролизуются

полностью, сшитые дуплексы не менее чем на 70% остаются без изменения.

Оказалось, что эффективность реакции между тяжами модифицированного дуплекса существенно выше при повышенной термической устойчивости дуплекса-предшественника. Действительно, если при температуре плавления 20-звенного дуплекса-предшественника, равной 37°C, выход ковалентно сшитого дуплекса составлял 26% [1], то при температуре плавления дуплексов С–J около 75°C выход сшитых дуплексов C^{cl}–J^{cl} составляет в среднем 80% (таблица).

Сдвиг модифицированных звеньев на два нуклеозида друг относительно друга (дуплексы D и F) существенно не сказывается на эффективности реакции. С другой стороны, изменение места сшивки может значительно влиять на выход ковалентно связанного продукта (например, дуплексы С, D и G, H, см. таблицу). Причина этого явления в данный момент выяснена не полностью. Вероятно, это связано с локальными сиквенс-зависимыми микроискажениями параметров двойной спирали ДНК-дуплекса.

Для дуплексов E и J наряду с образованием продукта с двумя поперечными сшивками наблюдали также появление дуплексов, содержащих по

одной ковалентной связи между тяжами. С помощью ион-парной ВЭЖХ разделить эти продукты не удастся. При анализе реакционных смесей в ПААГ можно наблюдать появление двух зон, каждая из которых соответствует дуплексам с одной или двумя шивками (рис. 2, 4).

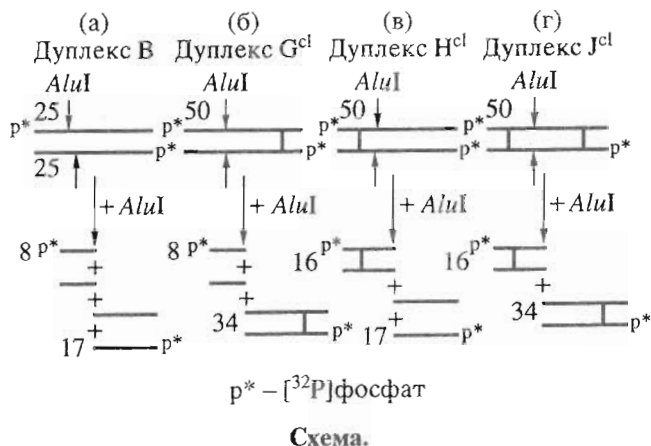
Сайт-специфичное расщепление шитых дуплексов эндонуклеазой рестрикции *AluI* проводили для подтверждения структуры синтезированных субстратов. В качестве контроля использовали немодифицированный дуплекс В. Продукты реакции enzymатического гидролиза анализировали методом электрофореза в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Образование олигонуклеотидов – продуктов гидролиза различной длины в случае расщепления шитых дуплексов и контрольных дуплексов иллюстрируется схемой.

При гидролизе ферментом *AluI* немодифицированного 25-звенного дуплекса В (схема, а) образуются два 8- и два 17-звенных олигонуклеотида. Если оба олигонуклеотида, составляющих дуплекс, содержали ³²P-метку, на радиоавтографе будут видны две полосы, соответствующие 8- и 17-звенникам. Взаимное расположение шивки и сайта рестрикции в дуплексе определяет состав гидролизата. В случае дуплекса Н^{cl} (схема, в; обе цепи дуплекса меченые) на радиоавтографе можно будет идентифицировать 16- и 17-звенные фрагменты (рис. 3, 5), при гидролизе дуплекса G^{cl} – 8- и 34-звенники (схема, б; рис. 3, 3), а при гидролизе дуплекса J – 16- и 34-звенные олигонуклеотиды (схема, г; рис. 3, 7). На основании данных рис. 3, которые соответствуют теоретической схеме, был сделан однозначный вывод о наличии ковалентных шивок между тяжами в полученных олигонуклеотидных дуплексах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5'-О-диметокситритил-3'-(N,N-диизопропиламино)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США); фосфодиэстеразу змеиного яда, щелочную фосфатазу (Sigma, США); 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (Merck, ФРГ), эндонуклеазу рестрикции *AluI* (50 ед. акт./мкл, НПО "Фермент", Литва).

Оптическое поглощение и УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см; за коэффициент молярного поглощения олигонуклеотидов принимали сумму коэффициентов составляющих мононуклеотидов [4]. Использовали эквимоллярные смеси компонентов. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном термостатированным кюветодержателем и блоком для измерения температуры, при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5°С/мин.



Синтез олигонуклеотидов осуществляли на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380В (США) с увеличением времени конденсации на стадии присоединения модифицированного звена до 5 мин, используя растворы модифицированных амидофосфитов с концентрацией 0.15 М. В качестве полимерных носителей использовали Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США). Деблокирование олигонуклеотидов после синтеза, анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов осуществляли как описано нами ранее [1].

Ацилирование янтарным ангидридом олигонуклеотидов, содержащих аминогруппу, и анализ

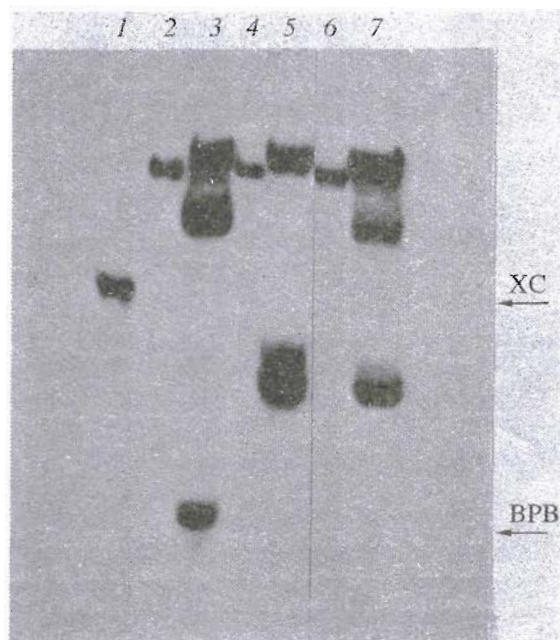


Рис. 3. Радиоавтограф (электрофорез в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины) реакционных смесей, полученных при расщеплении шитых дуплексов G^{cl} (3), H^{cl} (5), J^{cl} (7) эндонуклеазой рестрикции *AluI*. 1 – олигонуклеотид (1), 2, 4, 6 – дуплексы G^{cl}, H^{cl}, J^{cl} (контроли).

продуктов реакции проводили аналогично [1]. Выход карбоксилсодержащих олигонуклеотидов не менее 95%.

Реакцию между цепями модифицированных олигонуклеотидных дуплексов проводили в 0.05 М MES-буфере с pH 5.0 в присутствии 0.02 М хлорида магния. По 0.1 ОЕ₂₆₀ взаимно комплементарных олигонуклеотидов растворяли в 37 мкл буферного раствора, нагревали до 95°C, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 37 мкл 0.4 М раствора CDI в том же буфере и выдерживали 120 ч при 20°C. Степень превращения контролировали и продукт выделяли методом ионной ВЭЖХ в условиях, аналогичных [1].

Ферментативный гидролиз проводили аналогично [1].

Реакционные смеси анализировали методом электрофореза в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины. После проведения радиоавтографии из геля вырезали зоны, соответствующие исходному материалу и продуктам гидролиза. Их радиоактивность измеряли по методу Черенкова на счетчике Delta-300 (Tracor, Нидерланды).

5'-Концевое мечение олигонуклеотидов проводили с использованием [γ -³²P]АТФ и Т4-поли-нуклеотидкиназы ("Сибэнзим", Россия); меченые олигонуклеотиды выделяли путем электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ.

Денатурирующий электрофорез в 20% ПААГ (19 : 1 мономер/бис, 7 М мочевины) осуществляли

в 0.05 М трис-боратном буфере (pH 8.0) при 20°C. Гели экспонировали на рентгеновскую пленку с использованием усиливающего экрана.

ДНК-дуплексы расщепляли эндонуклеазой рестрикции *AluI* в 20 мкл буферного раствора, содержащего 0.01 М трис-НСl, 0.015 М MgCl₂, 0.15 М NaCl, 0.001 М дитиотреит. 0.03 ОЕ₂₆₀ дуплекса инкубировали 2 ч при 37°C в присутствии 25 ед. акт. *AluI*. Реакцию останавливали кратковременным нагреванием реакционной смеси до 95°C. Продукты реакции анализировали в денатурирующем 20% ПААГ как описано выше.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (94-04-12649а) и программы "Университеты России" (uni-011-95), подраздел "Фундаментальные исследования в химии".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анцыпович С.И., Орецкая Т.С., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташицкий В.Н., Шабарова З.А. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 774-780.
2. Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Орецкая Т.С., Шабарова З.А. // Биоорг. химия. 1993. Т. 19. С. 455-466.
3. Grimm S., Baeuerle P.A. // Biochem. J. 1993. V. 290. P. 297-308.
4. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. // Справочник по биохимии. Киев: Наук. думка, 1971. С. 154-269.

Cross-Linked DNA Duplexes: Synthesis and Properties

S. I. Antsyovich*, T. S. Oretskaya*,¹ E. A. Romanova*, E. M. Volkov*,
V. N. Tashlitskii*, M. Vasseur**, and Z. A. Shabarova*

* Chemical Faculty, Lomonosov State University, Moscow, 119899 Russia

** Genset Corporation, Paris, France

Abstract—Synthesis of cross-linked modified DNA duplexes is described. The structure of the duplexes was confirmed by digestion with the *AluI* restriction endonuclease. Thermostability and resistance to enzymatic hydrolysis of the cross-linked duplexes were studied.

Key words: modified oligonucleotides, 2'-amino-2'-deoxyuridine, cross-linked DNA duplexes.

¹ To whom all correspondence should be addressed.