



УДК 577.113.4:577.152.314'14

## ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЯХ УЧАСТКА УЗНАВАНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *EcoRII* ХИРАЛЬНЫЕ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫЕ ТИОФОСФАТНЫЕ ГРУППЫ

© 2003 г. Ф. В. Субач\*, С. Мюллер\*\*, В. Н. Ташлицкий\*, О. В. Пятраускене\*, Е. С. Громова\*\*

\* Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы;

\*\* Химический факультет университета им. А. Гумбольдта, Германия, Берлин

Поступила в редакцию 22.07.2002 г. Принята к печати 25.09.2002 г.

Для исследования взаимодействия эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с межнуклеотидными фосфатными группами ДНК получены двадцать четыре 12-звенных ДНК-дуплекса, в которых хиральная тиофосфатная группа последовательно замещает одну из межнуклеотидных фосфатных групп в участке узнавания *EcoRII* (5'ССА/ТGG) и рядом с ним. Синтезированы двенадцать 12-звенных олигонуклеотидов в виде смесей  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров. С помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием различных буферных систем осуществлено разделение шести смесей. Индивидуальные диастереомеры остальных олигонуклеотидов получены путем ферментативного лигирования на комплементарной ДНК-матрице предварительно разделенных с помощью ВЭЖХ  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров 5–7-звенных олигонуклеотидов с соответствующими короткими олигонуклеотидами.

*Ключевые слова:* олигонуклеотиды; разделение диастереомеров; тиофосфатная группа; эндонуклеаза рестрикции.

### ВВЕДЕНИЕ

Установлено, что для эндонуклеаз рестрикции (ЭР) большую роль играет их взаимодействие с углеводофосфатным остовом ДНК. Во-первых, электростатические взаимодействия белков с межнуклеотидными фосфатными группами ДНК вносят большой вклад в свободную энергию связывания [1]. Во-вторых, возможно “непрямое” считывание нуклеотидной последовательности ДНК через конформацию углеводофосфатного остова, зависящую от этой последовательности [2]. В-третьих, возможно, каталитический акт расщепления ЭР фосфодиэфирной связи происходит с участием фосфодиэфирной связи, соседней с расщепляемой [1].

Один из подходов, позволяющих изучать взаимодействие ЭР с межнуклеотидными фосфатными группами ДНК, состоит в использовании модифицированных аналогов субстратов этих ферментов. С помощью этого метода изучается влияние вносимых в ДНК модификаций, ослабляющих или полностью устраняющих контакты фермента с определенными атомами или группами атомов в ДНК. К настоящему времени в реакциях с

ЭР опробован широкий набор олигонуклеотидных аналогов, содержащих модификации межнуклеотидной фосфодиэфирной связи. Перспективными представляются ДНК-дуплексы, в которых фосфодиэфирные группы замещены на межнуклеотидные тиофосфатные группы. Тиофосфаты представляют собой наиболее консервативное изменение фосфатов, вносящее минимальные искажения в структуру ДНК-дуплекса [2–5]. Тиофосфатная группа существует в виде двух  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомерных форм. Поэтому с помощью индивидуальных диастереомеров можно исследовать взаимодействие ЭР с отдельными немостиковыми атомами кислорода межнуклеотидных фосфатных групп. Эта модификация была успешно использована для изучения взаимодействия с фосфатными группами ДНК ряда ЭР – *EcoRV* [2], *EcoRI* [6], *SfiI* [7] и др.

Объектом наших исследований является эндонуклеаза рестрикции *EcoRII* (КФ 3.1.21.4), узнающая короткую последовательность ДНК

$$\begin{array}{l} 5' \dots \downarrow \text{CCAGG} \dots \\ 3' \dots \text{GGTCC} \dots \end{array}$$

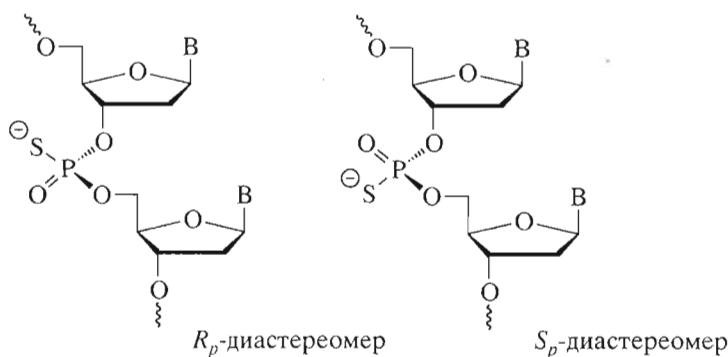
и расщепляющая межнуклео-

тидные связи в присутствии кофактора – ионов  $Mg^{2+}$  [8] (в местах, указанных стрелками).

Ранее изучалось влияние на взаимодействие с эндонуклеазой *EcoRII* модификаций межнуклео-

Сокращения: ФДЭ – фосфодиэстераза; ЭР – эндонуклеаза рестрикции.

# Автор для переписки (тел.: (095) 939-31-44; факс: (095) 939-31-81; эл. почта: gromova@belozersky.msu.ru).



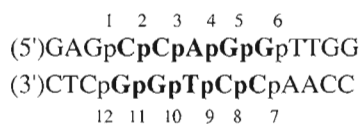
B – гетероциклическое основание.

тидных фосфатных групп участка узнавания путем замены фосфодиэфирной связи на пирофосфатную и фосфоамидную [9]. Для изменения пространственного расположения фосфодиэфирных связей в участок узнавания вводились также аналоги нуклеозидов, содержащие модифицированные углеводные остатки с изомерным атомом углерода в 3'-положении: 1-( $\beta$ -D-2'-дезокситреопентафуранозил)цитозин и/или 1-( $\beta$ -D-2'-дезокситреопентафуранозил)тимин [10]. Но модификации углеводофосфатного остова в этих работах не охватывали все фосфатные группы участка узнавания, и, кроме того, они вносили существенные искажения в структуру двойной спирали.

Цель нашей работы – получение полного набора аналогов субстрата эндонуклеазы *EcoRII* с одной хиральной тиофосфатной группой, которая последовательно замещает каждую фосфатную группу в участке узнавания и непосредственно рядом с ним. Это необходимо для систематического изучения взаимодействий между углеводофосфатным остовом ДНК и ферментом как на стадии образования фермент-субстратного комплекса, так и на стадии каталитического акта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индивидуальные  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеры олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидные тиофосфатные группы, могут быть получены либо путем обычного олигонуклеотидного



p – межнуклеотидные фосфатные группы, которые заменяли на тиофосфатные.

Схема.

синтеза с последующим разделением диастереомеров, либо с помощью стереоспецифических методов синтеза [11, 12]. Мы остановились на первом варианте из-за сложности стереоспецифического метода.

Для исследования взаимодействия эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с межнуклеотидными фосфатными группами ДНК в участке узнавания *EcoRII* (схема, выделен жирным шрифтом) или рядом с ним (всего 12 позиций) необходимо было сконструировать 24 несамокомплементарных 12-звенных ДНК-дуплекса, содержащих одну тиофосфатную группу в  $R_p$ - или  $S_p$ -конфигурации. Исходные смеси  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров 12-звенных модифицированных олигонуклеотидных цепей ( $I_{RS}$ )–( $XII_{RS}$ ) приведены в табл. 1.

### 1. Синтез и хроматографическое разделение $R_p$ - и $S_p$ -диастереомеров 12-звенных олигонуклеотидов

Синтез 12-звенных олигонуклеотидов ( $I_{RS}$ )–( $XII_{RS}$ ) (табл. 1), содержащих тиофосфатную группу, осуществлен с помощью стандартного амидофосфитного метода [2, 13]. Окисление йодом было заменено сульфированием 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксидом.

Разделение смеси  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров полностью деблокированных олигонуклеотидов ( $I_{RS}$ )–( $XII_{RS}$ ) было проведено с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (табл. 1). Были использованы четыре буферные системы (см. “Эксперимент. часть”). В отличие от системы 1 системы 2, 3 и 4 обладали ион-парными свойствами. В аммоний-ацетатном буфере (система 1) разделялась смесь ( $VIII_{RS}$ ), в триэтиламмоний-ацетатном буфере (система 2) – смесь ( $XI_{RS}$ ), а в морфолин- $CH_3COOH$ -буфере (система 3) – смеси ( $II_{RS}$ ) и ( $III_{RS}$ ). В буферной системе 4 на основе 1-метилпиперазина разделения не наблюдалось.

Для разделения смесей  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров других олигонуклеотидов в буферные системы

**Таблица 1.** Разделение методом ВЭЖХ смеси  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов, содержащих тиофосфатную группу

Олигонуклеотид		Буферная система <sup>в</sup>	Разделение диастереомеров <sup>г</sup>
шифр <sup>а</sup>	структура <sup>б</sup>		
(I <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- GAGs CCAGGTTGG	3a 1г	+ –
(II <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- GAGCs CAGGTTGG	3	+
(III <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- GAGCCs AGGTTGG	3 1б	+ –
(IV <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- GAGCCAs GGTTGG	1б, 1в, 2, 2a, 3a, 4	–
(V <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- GAGCCAGs GTTGG	2a, 3, 3a	–
(VI <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- GAGCCAGGs TTGG	1в, 1г, 3, 3a, 4	–
(VII <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- CCAAs CCTGGCT C	1б, 1г, 2a, 3a	–
(VIII <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- CCAACs CTGGCT C	1, 3a 1г	+ –
(IX <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- CCAACCs TGGCT C	1a, 3a 1г	+ –
(X <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- CCAACCTs GGCT C	1б, 1в, 2, 2a, 3, 3a, 4	–
(XI <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- CCAACCTGs GCT C	2, 2a	+
(XII <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )- CCAACCTGGs CTC	1a, 1г, 2a, 3a	–
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XIII <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-AsGGTTGG	1	+
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XIV <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-GAGCCAsG	1	–
(XIV <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-GAGCCAsG	3a	–
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XV <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-GsGGTTGG	1	+
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XVI <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-GsTTGG	1	+
(XVI <sub>RS</sub> )	GsTTGG	1	–
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XVII <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-CCAAsC	1, 3a	–
(XVII <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-CCAAsC	3a	+
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XVIII <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-TsGGCTC	1	+
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XIX <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-GGsCTC	1	+/-
(XIX <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-GGsCTC	1	+
(MeO) <sub>2</sub> Tr-(XX <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-(MeO) <sub>2</sub> Tr-TGGsCTC	1, 3a	–
(XX <sub>RS</sub> )	( $R_p, S_p$ )-TGGsCTC	3a	–

<sup>а</sup> Обозначения (I<sub>RS</sub>)–(XX<sub>RS</sub>) соответствуют смеси  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов, а используемые в тексте статьи обозначения (I<sub>R</sub>)–(XX<sub>R</sub>) и (I<sub>S</sub>)–(XX<sub>S</sub>) – индивидуальным  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомерам соответственно.

<sup>б</sup> Символ d (дезоксид) здесь и далее опущен. Жирным шрифтом выделена часть участка узнавания эндонуклеазы EcoRII. “s” – нехиральная тиофосфатная группа. ( $R_p, S_p$ ) – обозначение конфигурации тиофосфатной группы.

<sup>в</sup> См. “Эксперимент. часть”.

<sup>г</sup> “+” – разделение происходило ( $R_S \sim 0.3-1.5$ ); “+/-” – плохое разделение ( $R_S \leq 1$ ); “–” – разделение отсутствовало.

1–3 добавляли различные хиральные (*L*-цистеин и *L*-карнитин) и нехиральные (2-меркаптоэтанол) реагенты [2, 14, 15]. Добавление *L*-цистеина в буферную систему 1 (система 1a) привело к разделению смеси (IX<sub>RS</sub>). По сравнению с системой 2 в системе 2a наблюдалось улучшение разделения смеси (XI<sub>RS</sub>) (данные не приведены). Добавление *L*-карнитина в буфер 1 не привело к разделению  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров. Добавление в буферную систему 3 ацетата триэтиламмония привело к разделению (I<sub>RS</sub>), также наблюдалось улучшение

разделения (VIII<sub>RS</sub>) и (IX<sub>RS</sub>) по сравнению с разделением в буферных системах 1 и 1a соответственно (данные не приведены). Отметим, что в буфере 3a, содержащем смесь двух ион-парных реагентов (ацетат триэтиламмония и морфолин–CH<sub>3</sub>COOH), разделилась большая часть смесей, поэтому в нашем случае он является оптимальным. Добавление 2-меркаптоэтанол в буфер 1 не влияло на разделение диастереомеров.

В случае смесей (IV<sub>RS</sub>)–(VII<sub>RS</sub>), (X<sub>RS</sub>) и (XII<sub>RS</sub>) разделения достичь не удалось. Таким образом,

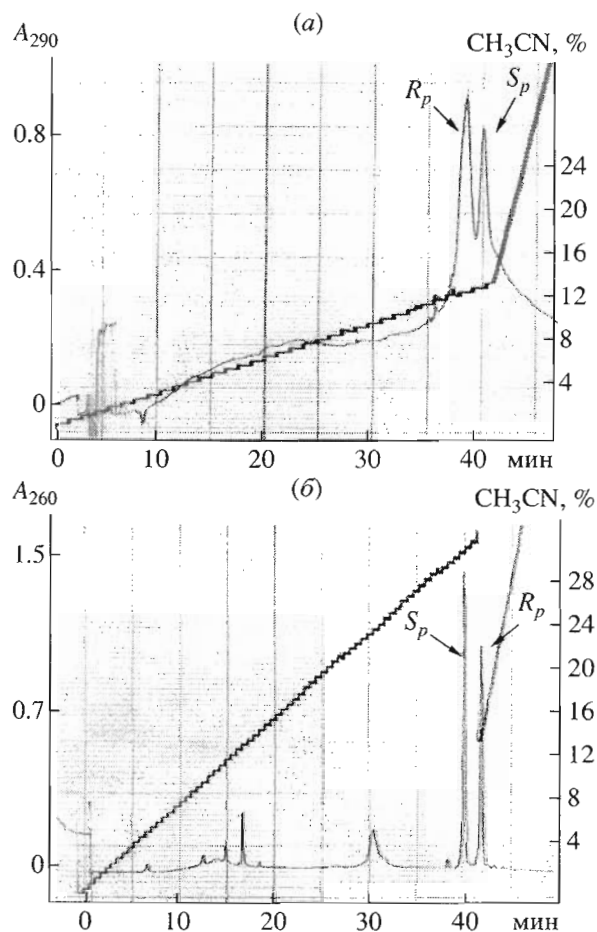


Рис. 1. Профили хроматографического разделения смеси  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов ( $VIII_{RS}$ ) в буферной системе 3а (а) и  $(MeO)_2Tr$ -( $XVI_{RS}$ ) в буферной системе 1 (б).

как отмечалось в работе [16], очевидно влияние на разделение диастереомеров положения тиофосфатной группы в олигонуклеотиде. Нуклеотидная последовательность олигонуклеотида также оказывает влияние на разделение. Так, смеси диастереомеров 12-звенных олигонуклеотидов с другой нуклеотидной последовательностью [2], со-

держащие тиофосфатную группу в тех же положениях относительно 5'-конца олигонуклеотида, что и в нашей работе, разделялись во всех случаях. Таким образом, хотя изменения буферной системы позволяют достичь в некоторых случаях разделения, невозможно предсказать, будет ли разделяться пара диастереомеров в данных условиях или нет. Поэтому разделение диастереомеров в каждом случае представляет собой отдельную задачу.

Типичный профиль хроматографического разделения на примере олигонуклеотида ( $VIII_{RS}$ ) приведен на рис. 1а. Соотношение пиков  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров во всех случаях составляло примерно 1 : 1. Исходя из рассчитанных значений разрешения, в худших случаях примесь другого диастереомера составляла не более 10%.

Рядом авторов было показано, что в используемых нами условиях  $R_p$ -диастереомер элюируется с колонки раньше  $S_p$ -диастереомера [2, 17]. Такая же последовательность выхода с колонки  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров была доказана и для наших соединений (см. ниже).

При разделении некоторых смесей наблюдалась примесь (несколько процентов) 12-звенного немодифицированного олигонуклеотида, которая элюировалась с колонки раньше диастереомеров. Ее присутствие объясняется, во-первых, не количественным переносом серы в синтетическом цикле, во-вторых, потерей серы во время деблокирования концентрированным аммиаком [18], и, в-третьих, замещением атома серы на атом кислорода при окислении йодом. Надо отметить, что чем лучше было разделение диастереомеров, тем лучше отделялся пик немодифицированного олигонуклеотида от пиков диастереомеров.

Из индивидуальных диастереомеров, полученных из смесей ( $I_{RS}$ )–( $III_{RS}$ ), ( $VIII_{RS}$ ), ( $IX_{RS}$ ) и ( $XI_{RS}$ ), были составлены ДНК-дуплексы, содержащие хиральную тиофосфатную группу в положениях 1–3, 8, 9 и 11 соответственно (см. схему).

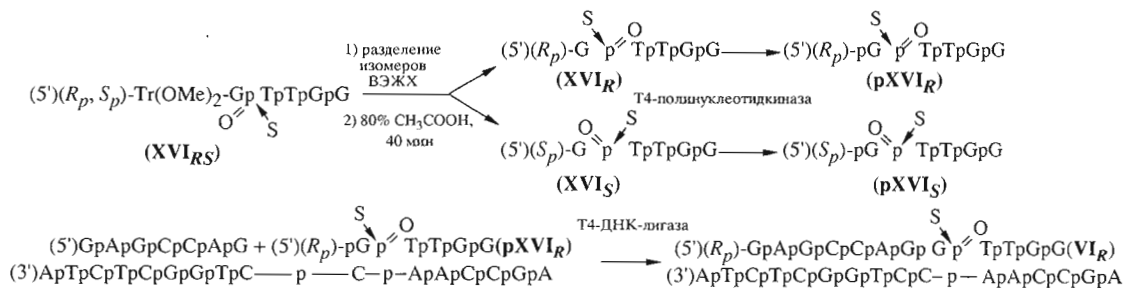


Рис. 2. Схема получения олигонуклеотида ( $VI_R$ ) с помощью ферментативного лигирования.

**Таблица 2.** Получение индивидуальных диастереомеров 12-звенных олигонуклеотидов путем введения в ферментативное лигирование на ДНК-матрице ВЭЖХ-разделенных  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров их фрагментов

Лигируемые олигонуклеотиды на комплементарных ДНК-матрицах <sup>a</sup>	Последовательность лигированного олигонуклеотида
(5') GAGCC+( $R_p$ )- p As GGTGG (3') САТАСТТСТСАТСТССТГГ — Тр ССААССГТСТСАТ	( $R_p$ )- GAGCCAs GGTGG ( <b>IV<sub>R</sub></b> )
(5')- GAGCC+( $S_p$ )- p As GGTGG (3') САТАСТТСТСАТСТССТГГ — Тр ССААССГТСТСАТ	( $S_p$ )- GAGCCAs GGTGG ( <b>IV<sub>S</sub></b> )
(5') GAGCCA+( $R_p$ )- p Gs GTTGG (3') САТАСТТСТСАТСТССТГГ — Ср СААССГТСТСАТ	( $R_p$ )- GAGCCAGs GTTGG ( <b>V<sub>R</sub></b> )
(5') GAGCCA+( $S_p$ )- p Gs GTTGG (3') САТАСТТСТСАТСТССТГГ — Ср СААССГТСТСАТ	( $S_p$ )- GAGCCAGs GTTGG ( <b>V<sub>S</sub></b> )
(5') GAGCCAG+( $R_p$ )- p Gs TTGG (3') АТСТССТГТС — Ср ААССГА	( $R_p$ )- GAGCCAGGs TTGG ( <b>VI<sub>R</sub></b> )
(5') GAGCCAG+( $S_p$ )- p Gs TTGG (3') АТСТССТГТС — Ср ААССГА	( $S_p$ )- GAGCCAGGs TTGG ( <b>VI<sub>S</sub></b> )
(5') CCAAs C+( $R_p$ )- p CTGGCTC (3') ТССТГТТрГ — ГАССГАТ	( $R_p$ )- CCAAs CCTGGCTC ( <b>VII<sub>R</sub></b> )
(5') CCAAs C+( $S_p$ )- p CTGGCTC (3') ТССТГТТрГ — ГАССГАТ	( $S_p$ )- CCAAs CCTGGCTC ( <b>VII<sub>S</sub></b> )
(5') CCAACC+( $R_p$ )- p Ts GGCTC (3') ССТГТТГГ — Ар ССГАГА	( $R_p$ )- CCAACCTs GGCTC ( <b>X<sub>R</sub></b> )
(5') CCAACC+( $S_p$ )- p Ts GGCTC (3') ССТГТТГГ — Ар ССГАГА	( $S_p$ )- CCAACCTs GGCTC ( <b>X<sub>S</sub></b> )
(5') CCAACCT+( $R_p$ )- p GGs CTC (3') ССТГТТГГА — ССр ГАГА	( $R_p$ )- CCAACCTGGs CTC ( <b>XII<sub>R</sub></b> )
(5') CCAACCT+( $S_p$ )- p GGs CTC (3') ССТГТТГГА — ССр ГАГА	( $S_p$ )- CCAACCTGGs CTC ( <b>XII<sub>S</sub></b> )

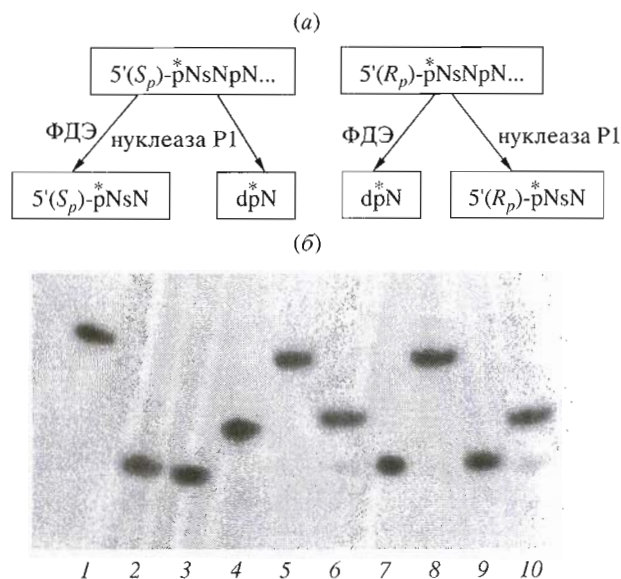
Олигонуклеотиды, содержащие хиральную тиофосфатную группу "s", ( $R_p$ )- или ( $S_p$ )-конфигурации, были получены в результате хроматографического разделения исходных смесей  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов (табл. 1).

## 2. Получение диастереомеров 12-звенных олигонуклеотидов, содержащих хиральную тиофосфатную группу, с помощью ферментативного лигирования преимущественно хроматографически разделенных 5–7-звенных олигонуклеотидов

Для получения индивидуальных  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров 12-звенных олигонуклеотидов (**IV**)–(**VII**), (**X**) и (**XII**) (см. схему, положение хиральной тиофосфатной группы в сайте узнавания 4–7, 10 и 12 соответственно) был разработан другой подход, приведенный на рис. 2, на примере получения олигонуклеотида (**VI<sub>R</sub>**). Суть метода состоит в том, что смесь диастереомеров коротких олигонуклеотидов разделяется лучше длинных. Целевой олигонуклеотид разбивается на два более коротких, один из которых содержит межнуклеотидную тиофосфатную группу. Проводится разделение диастереомеров, затем в соответствующий олигонуклеотид вводится 5'-концевая фос-

фатная группа и осуществляется его ферментативное лигирование с "дополняющим" олигонуклеотидом на комплементарной матрице. В табл. 2 приведен состав смесей для лигирования и 12-звенные продукты лигирования.

Синтез 5–7-звенных олигонуклеотидов осуществлен как описано выше. Далее проводили разделение диастереомеров с помощью ВЭЖХ либо до, либо после снятия 5'-концевой (MeO)<sub>2</sub>Tr-группы. В буферной системе 1 удалось разделить только смеси олигонуклеотидов (MeO)<sub>2</sub>Tr-(**XIII<sub>RS</sub>**), (MeO)<sub>2</sub>Tr-(**XV<sub>RS</sub>**), (MeO)<sub>2</sub>Tr-(**XVI<sub>RS</sub>**) и (MeO)<sub>2</sub>Tr-(**XVIII<sub>RS</sub>**), у которых межнуклеотидная тиофосфатная группа находится в первом положении от 5'-конца олигонуклеотида. Отметим, что смесь (**XVI<sub>RS</sub>**) (без (MeO)<sub>2</sub>Tr-группы) не разделялась. Типичный профиль хроматографического разделения на примере олигонуклеотида (MeO)<sub>2</sub>Tr-(**XVI<sub>RS</sub>**) приведен на рис. 1а.  $S_p$ -Диастереомер элюировался первым. Такая последовательность выхода



**Рис. 3.** Доказательство конфигурации индивидуальных  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов, содержащих первую с 5'-конца межнуклеотидную тиофосфатную группу. (а) Схема гидролиза  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров ФДЭ и нуклеазой P1. (б) Радиоавтограф разделения в 20% ПААГ продуктов гидролиза ФДЭ (дорожки 2, 6 и 9) и нуклеазой P1 (дорожки 3, 7 и 10) олигонуклеотидов GAGCCAG (XXI), ( $S_p$ )-GsTTGG ( $XVI_S$ ) и ( $R_p$ )-GsTTGG ( $XVI_R$ ) соответственно. Контроли: дорожки 1, 4, 5 и 8 – олигонуклеотиды (XXI), TrG, ( $XVI_S$ ) и ( $XVI_R$ ) соответственно. Метка  $^{32}\text{P}$  (p) вводилась по 5'-концу олигонуклеотидов до проведения гидролиза.

( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-содержащих диастереомеров согласуется с литературными данными [16]. Разделение не происходило в случае ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XVII_{RS}$ ) и было очень плохим в случае ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XIX_{RS}$ ). Поэтому эти олигонуклеотиды были разделены без ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-группы в системе 3а (( $XVII_{RS}$ ), табл. 1) и системе 1 (( $XIX_{RS}$ ), табл. 1). Конфигурация  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров была доказана обработкой ФДЭ и нуклеазой P1 (см. ниже).

Так как не разделялись диастереомеры олигонуклеотидов ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XIV_{RS}$ ), ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XVII_{RS}$ ), ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XIX_{RS}$ ) и ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XX_{RS}$ ), содержащих межнуклеотидную тиофосфатную группу в положениях соответственно 6, 4, 2 и 3 от 5'-конца олигонуклеотида, можно сделать вывод, что наличие ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-группы на 5'-конце олигонуклеотида способствует хорошему разделению диастереомеров только по первой с 5'-конца тиофосфатной группе. Можно предположить, что это явление связано с пространственным сближением между ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-группой и атомом серы тиофосфатной группы. Для  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров эта сближенность различна. В случае  $R_p$ -диастереомера, у которого это расстояние меньше, образуется гидрофобный кластер, включающий атом

серы и ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-группу. Этот кластер взаимодействует с гидрофобной поверхностью обращенно-фазового сорбента, увеличивая время выхода  $R_p$ -диастереомера по сравнению с  $S_p$ -диастереомером.

Из индивидуальных диастереомеров, полученных из соответствующих модифицированных олигонуклеотидов ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XIII_{RS}$ ), ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XV_{RS}$ ), ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XVI_{RS}$ ), ( $XVII_{RS}$ ), ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XVIII_{RS}$ ) и ( $XIX_{RS}$ ) и соответствующих коротких немодифицированных олигонуклеотидов на комплементарной матрице, были составлены ДНК-дуплексы для ферментативного лигирования до 12-звенных олигонуклеотидов (табл. 2). Выход лигирования варьировал от 30 до 80% и не зависел от конфигурации и положения тиофосфатной группы (данные не приведены). Сохранение конфигурации тиофосфатной группы после лигирования подтвердили для двух 12-звенных олигонуклеотидов ( $X_R$ ) и ( $X_S$ ) обработкой нуклеазой P1 и ФДЭ (данные не приведены).

Отметим, что для положений 4 и 12 в сайте узнавания (схема) была опробована другая разбивка (помимо приведенной в табл. 2), которая оказалась неудачной из-за того, что не удалось разделить смеси ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XIV_{RS}$ ) (или ( $XIV_{RS}$ )) (для положения 4) и ( $\text{MeO}$ )<sub>2</sub>Tr-( $XX_{RS}$ ) (или ( $XX_{RS}$ )) (для положения 12).

### 3. Определение конфигурации тиофосфатной группы

Определение конфигурации тиофосфатной группы в олигонуклеотидах осуществляли параллельной обработкой нуклеазой P1 (КФ 3.1.30.1) и ФДЭ (КФ 3.1.4.1) [16, 19]. Схема эксперимента по доказательству конфигурации у атома фосфора в межнуклеотидной тиофосфатной группе, первой с 5'-конца, приведена на рис. 3б.  $^{32}\text{P}$ -Меченые  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеры обрабатывают нуклеазой P1 или ФДЭ с последующим электрофорезом в ПААГ. ФДЭ хорошо расщепляет тиофосфатные связи в  $R_p$ -конфигурации и плохо – в  $S_p$ -конфигурации [2, 16]. Нуклеаза P1, наоборот, гидролизует тиофосфатные связи в  $S_p$ -конфигурации, а тиофосфаты в  $R_p$ -конфигурации устойчивы к ее гидролизу. Таким образом, после обработки  $R_p$ -диастереомера ФДЭ получается  $^{32}\text{P}$ -меченый нуклеотид, а после обработки нуклеазой P1 –  $^{32}\text{P}$ -меченый динуклеотидтиофосфат. В случае  $S_p$ -диастереомера, наоборот, обработка ФДЭ приводит к образованию  $^{32}\text{P}$ -меченого динуклеотидтиофосфата, а обработка нуклеазой P1 – к образованию  $^{32}\text{P}$ -меченого нуклеотида.

На рис. 3б в качестве примера приведены результаты гидролиза предполагаемых диастереомеров ( $XVI_S$ ) и ( $XVI_R$ ) ФДЭ и нуклеазой P1. В условиях исчерпывающего гидролиза немодифицированного олигонуклеотида (5')GAGCCAG (XXI)

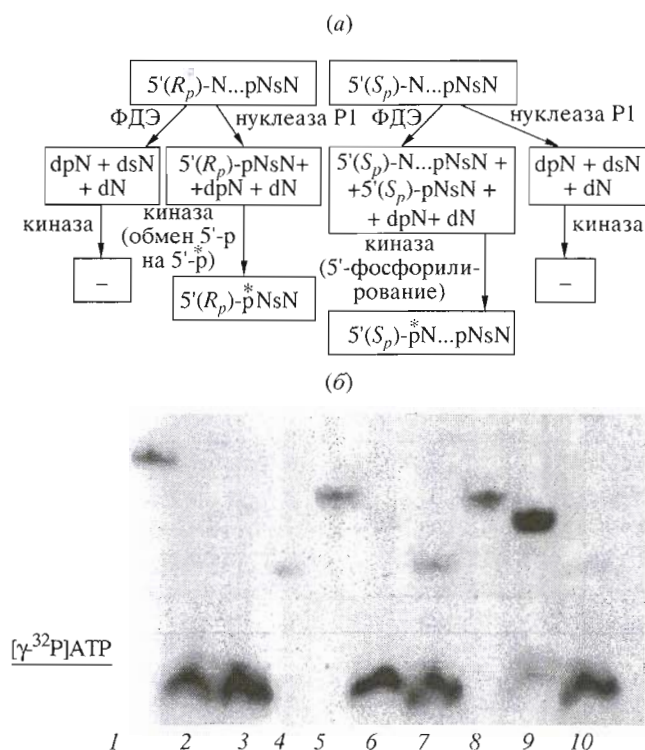
(дорожки 1–3) видно четкое различие в гидролизе диастереомеров ( $XVI_S$ ) и ( $XVI_R$ ). При гидролизе ФДЭ образование  $^{32}P$ -меченого динуклеотида наблюдается только в случае предполагаемого  $S_p$ -диастереомера (ср. дорожки 6 и 9), а при гидролизе нуклеазой P1 – только в случае предполагаемого  $R_p$ -диастереомера (ср. дорожки 7 и 10).

Для олигонуклеотидов с другой локализацией тиофосфатной группы вначале проводили гидролиз немеченых диастереомеров ФДЭ или нуклеазой P1, а затем обрабатывали продукты гидролиза Т4-полинуклеотидкиназой (КФ 2.7.1.78) и анализировали в ПААГ (рис. 4а). При гидролизе ФДЭ  $R_p$ -диастереомера получается нуклеозид и смесь нуклеотидов, а в случае гидролиза  $S_p$ -диастереомера дополнительно образуются динуклеотид-тиофосфат и олигонуклеотид с тиофосфатной группой в 3'-концевой части молекулы (образование динуклеотидтиофосфата можно объяснить примесями эндонуклеаз [20]). При обработке продуктов гидролиза Т4-полинуклеотидкиназой только в случае  $S_p$ -диастереомера получается  $^{32}P$ -меченый продукт в результате 5'- $^{32}P$ -фосфорилирования олигонуклеотида с тиофосфатной группой в 3'-концевой части молекулы. Обмена 5'-концевой фосфатной группы динуклеотидтиофосфата не происходит. При гидролизе нуклеазой P1  $S_p$ -диастереомера образуется нуклеозид и смесь нуклеотидов, в случае  $R_p$ -диастереомера дополнительно получается динуклеотидтиофосфат. После обработки Т4-полинуклеотидкиназой продуктов гидролиза только в случае  $R_p$ -диастереомера наблюдается образование  $^{32}P$ -меченого продукта вследствие обмена немеченой 5'-концевой фосфатной группы динуклеотидтиофосфата на  $^{32}P$ -меченую.

На рис. 4б в качестве примера приведены результаты гидролиза предполагаемых диастереомеров ( $XIX_R$ ) и ( $XIX_S$ ) ФДЭ и нуклеазой P1 с последующей обработкой Т4-полинуклеотидкиназой. В условиях исчерпывающего гидролиза немодифицированного олигонуклеотида ( $XXI$ ) (дорожки 1–3) видно четкое различие в гидролизе диастереомеров ( $XIX_R$ ) и ( $XIX_S$ ). При гидролизе нуклеазой P1 наблюдается образование  $^{32}P$ -меченого динуклеотидтиофосфата только в случае предполагаемого  $R_p$ -диастереомера (ср. дорожки 7 и 10). При гидролизе диастереомеров ФДЭ  $^{32}P$ -меченый олигонуклеотид (тринуклеотид) образуется только в случае  $S_p$ -диастереомера (ср. дорожки 6 и 9).

Аналогично была доказана конфигурация тиофосфатной группы у предполагаемых  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров остальных модифицированных олигонуклеотидов.

Таким образом, при исследовании гидролиза ДНК-дуплексов, содержащих хиральную тиофосфатную группу, эндонуклеазой рестрикции *EcoRII* выявлена неэквивалентность отдельных фосфат-



**Рис. 4.** Доказательство конфигурации индивидуальных  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов, содержащих межнуклеотидную тиофосфатную группу в любом положении цепи кроме первого с 5'-конца. (а) Схема гидролиза  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров ФДЭ и нуклеазой P1. (б) Радиоавтограф разделения в 20% ПААГ продуктов гидролиза ФДЭ (дорожки 2, 6 и 9) и нуклеазой P1 (дорожки 3, 7 и 10) олигонуклеотидов GAGCCAG ( $XXI$ ), GGsCTC ( $XIX_R$ ) и ( $R_p$ )-GGsCTC ( $XIX_S$ ) соответственно. Метка  $^{32}P$  (\*) вводилась по 5'-концу продуктов гидролиза. Контроли: дорожки 1, 4, 5 и 8 –  $^{32}P$ -меченые олигонуклеотиды ( $XXI$ ), АрТ, ( $XIX_R$ ) и ( $XIX_S$ ).

ных групп участка узнавания *EcoRII* во взаимодействии с этим ферментом. Обнаружено, что фосфатная группа, соседняя с расщепляемой связью, образует прямой контакт с ферментом. Эти данные согласуются с полученными ранее для ДНК-дуплексов, содержащих 1-( $\beta$ -D-2'-дезокситреопентафуранозил)цитозин и/или 1-( $\beta$ -D-2'-дезокситреопентафуранозил)тимин вместо остатков dC и dT в участке узнавания *EcoRII* [10].

В дальнейшем с помощью ДНК-дуплексов, содержащих хиральную тиофосфатную группу в участке узнавания *EcoRII* и непосредственно рядом с ним, будет детально исследовано взаимодействие эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с отдельными немостиковыми атомами кислорода фосфатных групп ДНК.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Ферменты.** Т4-полинуклеотидкиназа, Т4-ДНК-лигаза (МБИ "Fermentas", Литва, 30 тыс. ед. акт./мл, [КФ 6.5.1.1]), нуклеаза Р1 из *Penicillium citrinum* (Sigma, США, 1 мг/мл, 389 ед. акт./мл) и фосфодиэстераза типа I из яда *Crotalus adamanteus* Venom (Pharmacia Biotech, Швеция, 1 мг/мл, 19.5 ед. акт./мл).

Использовали [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТР (1000 Ки/ммоль) производства ВО "Изотоп" (Обнинск, Россия).

**Синтез олигонуклеотидов.** Олигонуклеотиды были синтезированы с помощью стандартного амидофосфитного метода на автоматическом ДНК-синтезаторе (Gene Assembler Plus, Pharmacia, Швеция) [2, 13]. Изменения стандартного регламента олигонуклеотидного синтеза в случае модифицированных олигонуклеотидов касались только стадии окисления йодом, которая была заменена сульфированием 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксидом. В ходе синтеза получалась смесь  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров. Олигонуклеотиды с  $(\text{MeO})_2\text{Tg}$ -группой на 5'-конце были сняты с полимера колонки обработкой концентрированным водным аммиаком (12 ч при 55°C) и затем очищены с использованием липофильных свойств  $(\text{MeO})_2\text{Tg}$ -группы обращенно-фазовой ВЭЖХ в буферной системе 1 (см. ниже).  $(\text{MeO})_2\text{Tg}$ -группа была удалена обработкой 80% уксусной кислотой в течение 30 мин при комнатной температуре.

**Хроматографическое разделение  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов.** Разделение смеси  $R_p$ - и  $S_p$ -диастереомеров олигонуклеотидов, полностью деблокированных или содержащих на 5'-конце  $(\text{MeO})_2\text{Tg}$ -группу, было проведено с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием градиентной системы Tracor (Нидерланды), УФ-детектора и колонки Burdick & Jackson (США) 4.6 × 250 мм с сорбентом С18 (размер частиц 5 мкм). Расход элюента 1 мл/мин, температура колонки 45°C. При этом использовались следующие буферные системы: 1 – 0.1 М аммонийацетат, 5% метанола, рН 6.5; 1а – система 1 + 1 мМ L-цистеин; 1б – система 1 + 2 мМ или 6 мМ L-карнитин; 1в – система 1 + 0.1 М N-метилморфолин-оксид; 1г – система 1 + 4 мМ 2-меркаптоэтанол; 2 – 0.1 М триэтиламмонийацетат, 5% метанола, рН 6.5; 2а – система 2 + 1 мМ L-цистеин; 3 – 0.1 М морфолин-CH<sub>3</sub>COOH, 5% метанола, рН 6.5; 3а – система 3 + 0.1 М ацетат триэтиламмония; 4 – 0.1 М 1-метилпиперазин-CH<sub>3</sub>COOH, 5% метанола, рН 7.0.

Во всех случаях использовали линейный градиент ацетонитрила от 0 до 40% со скоростью 0.3 или 0.7 %/мин.

**5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов** проводили как описано ранее [9]: 5–7 нмоль олигонуклеотидов фосфорилировали 30 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы в 20 мкл 50 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.8), содержащего 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ

дितिотреит, 20 мМ АТР, 25 мкг/мл бычий сывороточный альбумин (BSA), 3 ч при 37°C. В первые 1.5 ч добавляли 15 ед. акт. киназы, а через 1.5 ч добавляли еще 15 ед. акт. киназы. Киназу денатурировали нагреванием до 95°C в течение 5 мин.

Электрофоретическое разделение олигонуклеотидов здесь и далее осуществляли в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины.

**Гидролиз нуклеазой Р1** 0.01 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотидов проводили 2 мкг фермента в 20 мкл 30 мМ CH<sub>3</sub>COONa (рН 5.3), содержащего 0.2 мМ ZnCl<sub>2</sub>, 2 ч при 37°C и 2 ч при 50°C.

**Гидролиз ФДЭ** 0.01 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотидов осуществляли 2 мкг фермента в 20 мкл 200 мМ Трис-НСI-буфера (рН 8.5), содержащего 40 мМ MgCl<sub>2</sub>, в течение 12 ч при 37°C.

**Ферментативное лигирование.** Эквимолярные количества (5–7 нмоль) комплементарных олигонуклеотидов (табл. 2) лигировали 30 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы в 20 мкл 40 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.8), содержащего 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дितिотреит, 5 мМ АТР, 2 ч при 16°C, 2 ч при 10°C и 12 ч при 4°C. Целевой олигонуклеотид выделяли с помощью электрофореза в ПААГ.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ю.Н. Яковлевой, Е.М. Волкову и В.Г. Метелеву за ценные советы, касающиеся эксперимента. Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 01-04-48637).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pingoud A., Jeltsch A. // Eur. J. Biochem. 1997. V. 246. P. 1–22.
2. Thorogood H., Grasby J.A., Connolly B.A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 8855–8862.
3. Lesser R.D., Grajkowski A., Kurpiewski M.R., Koziolkiewicz M., Stec W.J., Jen-Jacobson L. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 24810–24818.
4. Hartmann B., Bertrand H.-O., Femandjian S. // Nucl. Acids Res. 1999. V. 27. P. 3342–3347.
5. Bertrand H.O., Pullman A., Zakrzewska K., Hartmann B., Femandjian S. // Theor. Chem. Acc. 1999. V. 101. P. 269–273.
6. Kurpiewski M.R., Koziolkiewicz M., Wilk A., Stec W.J., Jen-Jacobson L. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 8846–8854.
7. Nobbs T.J., Williams S.A., Connolly B.A., Halford S.E. // Biol. Chem. 1998. V. 379. P. 599–604.
8. Krueger D.H., Kupper D., Meisel A., Reuter M., Schroeder C. // FEMS Microbiol. Rev. 1995. V. 17. P. 177–184.
9. Gromova E.S., Kubareva E.A., Vinogradova M.N., Oretskaya T.S., Shabarova Z.A. // J. Mol. Recognit. 1991. V. 4. P. 133–141.



10. *Petrauskene O.V., Yakovleva J.N., Alekseev Ya.I., Subach F.V., Babkina O.V., Gromova E.S.* // *J. Biol. Structure and Dynamics*. 2000. V. 17. P. 857–870.
11. *Uhlmann E., Peyman A.* // *Chemical Reviews*. 1990. V. 90. P. 544–584.
12. *Beaucage S.L., Iyer R.P.* // *Tetrahedron*. 1993. V. 49. P. 6123–6194.
13. *Iyer R.P., Phillips L.R., Egan W., Regan J.B., Beaucage S.L.* // *J. Org. Chem.* 1990. V. 55. P. 4693–4699.
14. *Nobbs T.J., Williams S.A., Connolly B.A., Halford S.E.* // *Biol. Chem.* 1998. V. 379. P. 599–604.
15. *Tamura Y., Miyoshi H., Yokota T., Makino K., Murakami A.* // *Nucleosides Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 269–282.
16. *Stec W.J., Zon G.* // *Tetrahedron Lett.* 1984. V. 25. P. 5275–5278.
17. *Cheruvallath Z.S., Sasmor H., Cole D.L., Ravikumar V.T.* // *Nucleosides Nucleotides*. *Nucl. Acids*. 2000. V. 19. P. 533–543.
18. *Reese C.B., Song Q.* // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2943–2944.
19. *Mizuuchi K., Nobbs T.J., Halford S.E., Adzuma K., Qin J.* // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 4640–4648.
20. *Bowman K.J., Pla R.L., Guichard Y., Farmer P.B., Jones G.D.D.* // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. e101.

## Preparation of DNA Duplexes Containing Internucleotide Phosphorothioate Groups in Various Positions of the Recognition Site for the *EcoRII* Restriction Endonuclease

F. V. Subach\*, S. Müller\*\*, V. N. Tashlitsky\*, O. V. Petrauskene\*, and E. S. Gromova\*\*

#Phone: +7 (095) 939-3144; fax: +7 (095) 939-3181; e-mail: gromova@belozersky.msu.ru

\*Department of Chemistry and Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

\*\*Department of Chemistry, Humboldt University, Berlin, 10099 Germany

Twenty-four 12-mer DNA duplexes, each containing a chiral phosphorothioate group successively replacing one of the internucleotide phosphate groups either in the *EcoRII* recognition site (5'CCA/TGG) or near to it, were obtained for studying the interaction of the restriction endonuclease *EcoRII* with internucleotide DNA phosphates. Twelve of the 12-mer oligonucleotides were synthesized as  $R_p$  and  $S_p$  diastereomeric mixtures. Six of them were separated by reversed-phase HPLC using various buffers. Homogeneous diastereomers of the other oligonucleotides were obtained by enzymatic ligation of the  $R_p$  and  $S_p$  diastereomers of 5- to 7-mer oligonucleotides preliminarily separated by HPLC with the corresponding short oligonucleotides on a complementary DNA template. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* oligonucleotides, phosphorothioate group, restriction endonucleases, separation of diastereomers