



УДК 577.113.4

© 1990 г.

С. А. Кузнецова, М. Г. Ивановская, Э. А. Шабарова

**ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ
IX *. НАПРАВЛЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ ЗАМЕЩЕННЫХ
ПИРОФОСФАТНЫХ СВЯЗЕЙ В СТРУКТУРУ ДНК**

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет и межфакультетская проблемная
научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. И. Белозерского*

Впервые осуществлен целенаправленный высокоэффективный синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих в заданном положении сахарофосфатного остова замещенную пирофосфатную связь. Синтез проводили путем конденсации на комплементарной матрице двух гептануклеотидов, один из которых содержал на 3'-концевой фосфатной группе остатки алифатического спирта или амина, а 5'-концевая фосфатная группа другого была активирована. Активацию проводили с помощью EDAC либо методом N-оксибензотриазоловых эфиров; показано, что карбодимидная конденсация протекает с большей эффективностью (35–80%), чем при использовании активированных эфиров. Подобраны условия мягкого избирательного расщепления замещенной пирофосфатной связи в водной среде.

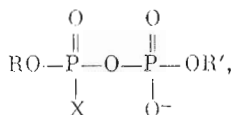
Синтетические олигонуклеотиды с модифицированным сахарофосфатным остовом в настоящее время широко используются в различных областях биоорганической химии, молекулярной биологии и генетической инженерии [2–4]. Эти соединения, сохраняя способность образовывать специфические комплементарные комплексы, обладают рядом уникальных свойств. Так, некоторые из них становятся устойчивыми к действию эндо- и экзонуклеаз, что позволяет использовать их в качестве пегидролизуемых аналогов для изучения механизма действия этих ферментов [5]. Кроме того, в результате модификации сахарофосфатного остова олиго(поли)нуклеотиды приобретают способность проникать через клеточную мембрану [6, 7], и это дает возможность направленно воздействовать на процессы экспрессии генетического материала [8, 9] и открывает перспективы использования их в качестве противоопухолевых и противовирусных агентов [10–12].

Направленную модификацию сахарофосфатного остова олиго(поли)нуклеотидов проводят, как правило, в процессе их химического синтеза. Альтернативный подход, развиваемый в нашей лаборатории и базирующийся на использовании принципа химического лигирования, заключается в синтезе модифицированной межнуклеотидной связи в результате конденсации олигонуклеотидных блоков, сближенных на комплементарной матрице [13–15].

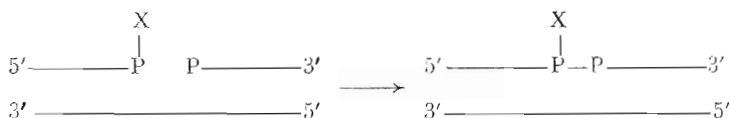
В настоящем сообщении представлен способ получения модифицированных ДНК-дуплексов, содержащих в заданном положении сахарофос-

* Сообщение VIII см. в [1]. Сокращения: EDAC — 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид; MeIm — N-метилимидазол; MES — 2-морфолиноэтансульфонислота; ПААГ — полиакриламидный гель, Нерес — N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-этаносульфонат. Символ d (деокси) в обозначении дезоксиолигорибонуклеотидов опущен. ³²P — ³²P-меченая фосфатная группа.

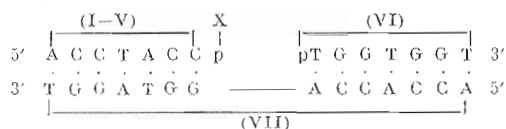
фатного остова замещенную пирофосфатную связь:




где R, R' — остатки олигонуклеотидов, X — остатки алифатического спирта или амина. Трзамещенные пирофосфаты нуклеозидной природы ранее были синтезированы в безводных средах [16, 17], а также наблюдались в качестве побочных продуктов при проведении фосфодиэфирного олигонуклеотидного синтеза [18]. Из-за лабильности ангидридной связи выделить и охарактеризовать их в водной среде долго не удавалось. Позднее при изучении механизма фосфодиэфирного синтеза олигонуклеотидов методом ЯМР-спектроскопии было зарегистрировано существование трзамещенного пирофосфата в водной среде [19]. Мы предлагаем эффективный метод синтеза замещенной пирофосфатной связи в синтетическом ДНК-дуплексе, осуществляемый в водной среде по следующей схеме:



Работа выполнена на ДНК-комплексах, состоящих из трех синтетических олигонуклеотидов:



- где X — — OH (I), комплекс (а);
 —OC₂H₅ (II), комплекс (б);
 —NHС₄H₉ (III), комплекс (в);
 —N  O (IV), комплекс (г);
 —NHСН₂СООС₂H₅ (V), комплекс (д).

Исходные олигонуклеотиды (I), (VI) и (VII) синтезировали фосфотриэфирным блочным методом в растворе [20]. Для модификации концевого фосфата проводили конденсацию незащищенного гептануклеотида (I) с соответствующим спиртом, амином или аминокислотой в водной среде под действием EDAC как описано ранее [21]. Соединения с модифицированным концевым фосфатом (II—V) выделяли МКХ, выход 90—98%. При анionoобменной хроматографии подвижность (II—V) отличается от подвижности исходного гептануклеотида (I) (см. пример на рис. 1). Наличие заместителей у фосфомоноэфирной группы в соединениях (II—V) подтверждали также их устойчивостью к действию фосфомоноэстеразы. Природу образующейся фосфоамидной связи в соединениях (II—V) подтверждали ее избирательным гидролизом 15% СН₃СООН при 50°С в течение 40 мин. В результате гидролиза пик, соответствующий по хроматографической подвижности производным (III—V), смещаются в положение, соответствующее исходному незамещенному гептануклеотиду (I). Для соединения (V) проводили также гидролиз сложноэфирной связи смесью пиридин — триэтиламин — вода (2 : 3 : 5) [22]. Появление дополнительного отрицательного заряда регистрировали по изменению подвижности при МКХ и электрофорезе в 20% ПААГ. Ранее мы установили, что температура плавления комплекса (а) в 0,05 М MES-буфере (рН 6,0), содержащем 0,02 М MgCl₂, при суммарной нуклеотидной концентрации 10⁻³ М составляет 28°С [15]. Мы также показали, что введение заместителя по 3'-концу гептануклеотида (I) не влияет на устойчивость комплекса. Поэтому реакции в комплексах (а—д) в настоящей

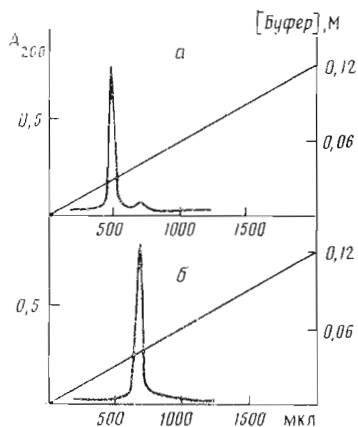


Рис. 1

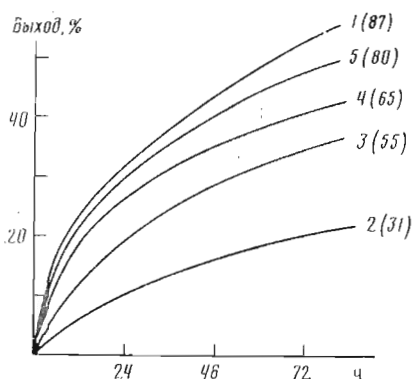


Рис. 3

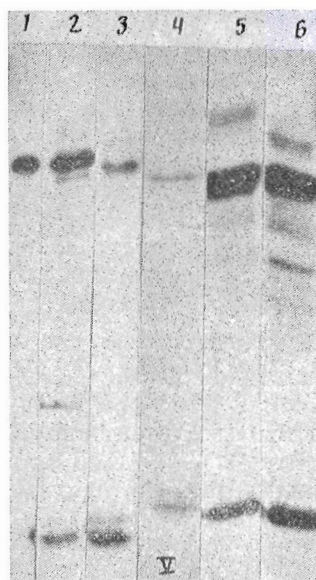


Рис. 2

Рис. 1. Микроколоночная хроматография реакционной смеси, образующейся при синтезе этилового эфира гептануклеотида (II) (а) и исходного гептануклеотида (I) (б). Условия хроматографии см. в «Экспер. части»

Рис. 2. Электрофорез реакционных смесей, образующихся в результате карбодимидной конденсации в дуплексах (а–д). 1 – ^{32}P АССТАСррТGGTGCT. 2 – реакционная смесь, образующаяся при проведении конденсации в дуплексе (а), 3 – в дуплексе (б), 4 – в дуплексе (в), 5 – в дуплексе (г), 6 – в дуплексе (д). На дорожках 2–6 ^{32}P -метка находится на 5'-конце олигонуклеотидов (I–V)

Рис. 3. Кривые накопления продуктов карбодимидной конденсации в дуплексах (а–д). В скобках указаны выходы продуктов после повторного добавления EDAC. 1 – накопление тризамещенного пирофосфата при проведении конденсации в дуплексе (а), 2 – в дуплексе (б), 3 – в дуплексе (в). 4 – в дуплексе (г), 5 – в дуплексе (д)

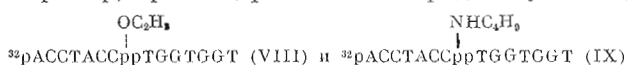
работе проводили при 0°C в условиях их полной термической устойчивости.

Для синтеза межнуклеотидной связи в комплексах (а–д) мы использовали два метода активации фосфатной группы – карбодимидный и метод N-оксибензотриазоловых эфиров [13]. Хотя оба метода позволяют осуществлять конденсации в комплексах (а–д) с образованием тетрадекануклеотидов, содержащих межнуклеотидную замещенную пирофосфатную связь, метод N-оксибензотриазоловых эфиров дает выходы продуктов химического лагирования в дуплексах (в–д) лишь 10–15%, тогда как карбодимидная конденсация – 35–80%. В связи с этим последний вариант конденсации был изучен более детально (рис. 2, 3). Из рис. 3 видно, что в целом скорость накопления тетрадекануклеотидов с замещенной пирофосфатной связью ниже, чем с незамещенной. Сравнивая скорости реакций с участием различных производных (II–V), следует отметить, что производные, в которых связь между фосфатной группой и заместителем имеет фосфоамидную природу, реагируют быстрее (кривые

3–5), чем производное с фосфодиэфирной связью (кривая 2). Различие в скоростях реакций связано, очевидно, с различием в нуклеофильности моно- и различным образом дизамещенных фосфатных групп. Наиболее нуклеофильной группировкой из приведенных является днанион-фосфат, затем моноанион-фосфат амидоэфирной структуры и, наконец, диэфирный моноанион-фосфат (рис. 3).

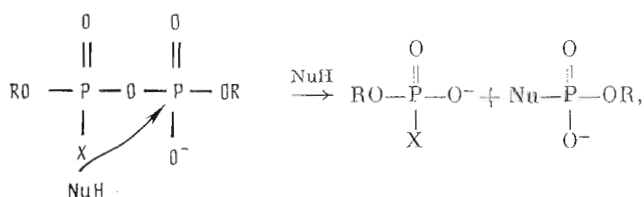
Полученные результаты согласуются с данными по реакционной способности нуклеофильных агентов в реакциях бимолекулярного нуклеофильного замещения у пятикоординационного атома фосфора [23]. Более высокая нуклеофильность амидофосфатов связана, по-видимому, с тем, что дефицит электронов на атоме фосфора в фосфоамидах частично компенсируется за счет $p_\pi-d_\pi$ -сопряжения между атомами N и P, что и может приводить к повышению электронной плотности на атоме кислорода.

Оказалось, что в водной среде при нейтральных значениях pH (6–8) и 37° С тетрадекануклеотиды с замещенной пирофосфатной связью устойчивы. В то же время в присутствии нуклеофильных агентов, таких, как первичные алифатические или третичные ароматические амины, или в среде, содержащей фосфат-анион, эти соединения расщепляются по замещенной пирофосфатной связи с образованием исходных олигонуклеотидов. Так, например, при выдерживании тетрадекануклеотидов



в 0,4 М водном растворе N-метилмидазола (pH 8,0) или в 0,05 М Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,2 М NaCl и 0,12 М MgCl₂, образуются соответственно ${}^{32}\text{pACCTACCp}(\text{OC}_2\text{H}_5)$ (II) и ${}^{32}\text{pACCTACCp} \cdot (\text{NHC}_4\text{H}_9)$ (III) (37° С, 3 сут). Обработка тех же тетрадекануклеотидов, содержащих радиоактивную метку в середине цепи

($\overset{\text{X}}{\text{ACCTACCp}}-{}^{32}\text{pTGGTGGT}$), 0,5 М водным раствором этилендиамина (pH 8,0) также приводит к полному расщеплению пирофосфатной связи (37° С, 1 сут). На рис. 4 представлен состав продуктов расщепления и видно, что единственным продуктом является $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}){}^{32}\text{pTGGTGGT}$. Совокупность этих данных позволяет сделать однозначный вывод о том, что нуклеофильное замещение у атома фосфора в полученных тризамещенных пирофосфатах протекает по ионизованной фосфатной группе:



где RO — олигонуклеотидная цепь, X — заместитель у атома P, NuH — нуклеофильный агент.

Аналогичный ход реакции известен для тризамещенных пирофосфатов нуклеозидной природы при их взаимодействии с нуклеофильными реагентами в безводной среде [18, 24]. Описанные выше условия реакций, приводящие к расщеплению замещенной пирофосфатной связи, являются условиями избирательного расщепления подобного рода соединений и могут служить для доказательства их структуры.

Ферментативный гидролиз ${}^{32}\text{P}$ -меченых тетрадекануклеотидов с замещенной пирофосфатной связью фосфодиэстеразой змеиного яда приводит к образованию ${}^{32}\text{P}$ -меченых гептануклеотидов (II–V), содержащих заместитель на 3'-концевой фосфатной группе (см., например, рис. 5). Состав продуктов гидролиза свидетельствует о том, что замещенная пирофосфатная связь гидролизует ферментом, тогда как дальнейший гидролиз амидофосфата или фосфодиэфира, как и следовало ожидать, ингибируется.

Таким образом, в настоящей работе впервые осуществлен синтез олигонуклеотидов, содержащих в заданном положении сахарофосфатного остова замещенную пирофосфатную связь. Показано, что эта связь доста-

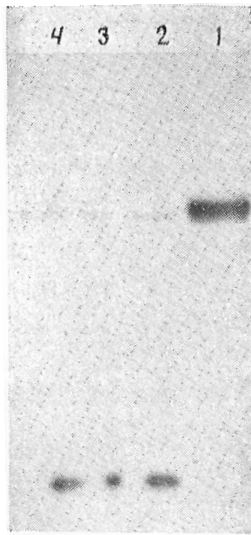


Рис. 4



Рис. 5

Рис. 4. Электрофорез реакционной смеси, образующейся после обработки $\text{NH}_2\text{C}_4\text{H}_9$

АССТАССР—¹—²РТGGTGGT (IX) 0,5 М водным этилендиамином (рН 8,0) при 37° С. 1 — (IX), 2—4 — продукты реакции после инкубации реакционной смеси в течение 1 ч, 2,5 ч, 1 сут соответственно

Рис. 5. Электрофорез продуктов гидролиза соединений (VIII) и (IX) фосфодиэстеразой змеиного яда. 1, 4 — соединения (VIII) и (IX), 2, 3 — соответствующие продукты гидролиза (VIII) и (IX)

точно устойчива в водной среде и в то же время может быть легко и количественно расщеплена в мягких условиях под действием нуклеофильных агентов. Тризамещенные пирофосфаты олигонуклеотидной природы являются эффективными фосфорилирующими агентами в водной среде. В связи с этим мы считаем, что ДНК-дуплексы с предлагаемым типом модификации сахарофосфатного остова смогут найти применение в качестве реагентов для аффинного мечения белков, узнающих определенные нуклеотидные последовательности. При этом важным преимуществом такого рода реагентов является то, что они должны модифицировать нуклеофильную группу аминокислоты, находящейся в непосредственной близости от тризамещенной пирофосфатной группировки модифицированного ДНК-дуплекса.

Олигонуклеотиды с замещенной пирофосфатной связью могут быть использованы также в качестве зондов, содержащих группы-маркеры в середине сахарофосфатного остова, и в генно-инженерных исследованиях в качестве реагентов направленного мутагенеза.

Экспериментальная часть

В работе использованы EDAC, MES, морфолин (Merck, ФРГ); полисил СА (ЧССР); N-оксибензотриазол (Fluka, Швейцария); Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78; НИО «Фермент», Вильнюс); фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1; Worthington Biochemical Corp., США); АТФ, этиловый эфир глицерина (Serva, ФРГ), бутиламин (Aldrich, США); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ (1000 Кп/ммоль; «Изотоп»); биогель Р-2, 200—400 меш (Bio-Rad, США).

$5'\text{-}^{32}\text{P}$ -Метку вводили фосфорилированием олигонуклеотидов (I—V)

с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Концентрацию олигонуклеотидного материала определяли спектрофотометрически в расчете на мономерное звено.

Буферы: 0,05 М MES (рН 6,0), содержащий 0,02 М $MgCl_2$ (А); 0,05 М трис-борат (рН 8,5), содержащий 1 мМ EDTA (Б); 0,4 М метилпиперазидол (рН 8,0), содержащий 0,2 М NaCl и 0,12 М $MgCl_2$ (В); 0,2 М HEPES (рН 8,7), содержащий 0,1 М $MgCl_2$ (Г).

Конденсация олигонуклеотидов под действием EDAC. 0,1–2,0 ОЕ₂₆₀ смеси эквимольных количеств олигонуклеотидов в буфере А (суммарная нуклеотидная концентрация 10^{-3} М) обрабатывали 0,2 М EDAC 3 сут при 0° С, затем снова добавляли EDAC до конечной концентрации 0,4 М и смесь выдерживали еще 3 сут. Выходы продуктов конденсации в комплексах (а–д) составили соответственно 87, 31, 55, 80 и 65%.

Конденсация с участием N-оксибензотриазоловых эфиров олигонуклеотидов. N-Оксибензотриазоловые эфиры получали как описано в работе [21]. К N-оксибензотриазоловому эфиру олигонуклеотида добавляли раствор двух других входящих в состав комплекса олигонуклеотидов в буфере Г таким образом, чтобы суммарная нуклеотидная концентрация составляла 10^{-3} М. Олигонуклеотиды брали в эквимольных количествах. Реакционную смесь инкубировали 3 сут при 0° С.

Разделение реакционных смесей после конденсации проводили МКХ на полисилле СА в 20% ацетонитриле в градиенте концентраций пирофосфата натрия (0–0,12 М) при рН 6,5, а также электрофорезом ³²P-меченых соединений в пластинах (20×60×0,04 см) 20% ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в буфере Б при постоянном напряжении 1000 В с последующей радиоавтографией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долинина Н. Г., Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1346–1354.
2. Abramova T. V., Vlassov V. V., Lebedev A. V., Rytte A. S. // FEBS Lett. 1988. V. 236. № 1. P. 243–245.
3. Noble S. A., Fisher E. F., Caruthers M. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 7. P. 3387–3404.
4. Taylor J. W., Ott J., Eckstein F. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8765–8785.
5. Agrawal S., Goodchild J. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 31. P. 3539–3542.
6. Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Стефанович Л. Е., Шешегова Е. А. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. № 1. С. 110–113.
7. Miller P. S., McParland K. B., Jayaraman K., Ts'o P. O. P. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 7. P. 1874–1880.
8. Marcus-Sekura C. J., Woerner A. M., Shinozuka K., Zon G., Quinnan G. V. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 14. P. 5749–5763.
9. Stein C. A., Subasinghe C., Morgan N., Neckers L., Cohen J. // Perspectives in therapeutic and diagnostic application of oligonucleotide derivatives. International workshop. Novosibirsk Academgorodok. USSR. August 8–12. 1988. P. 10–11.
10. Smith C. C., Aurelian L., Reddy M. P., Miller P. S., Ts'o P. O. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 9. P. 2787–2791.
11. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. S., Broder S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 11. P. 7706–7710.
12. Agrawal S., Goodchild J., Civeira M. P., Thornton A. M., Sarin P. S., Zamecnik P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 10. P. 7079–7083.
13. Shabarova Z. A. // Biochimie. 1988. V. 70. № 5. P. 1323–1334.
14. Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1139–1141.
15. Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Готтих М. Б., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 490–499.
16. Микельсон А. М. Химия нуклеозидов и нуклеотидов. М.: Мир, 1962. С. 326–344.
17. Khorana H. G., Vizsolvi J. P., Ralph R. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1961. V. 84. № 3. P. 414–418.
18. Зарытова В. Ф. // Итоги науки и техники. Серия «Биоорганическая химия». М., ВИНТИ, 1984. Т. 4. С. 68–72.
19. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвукин А. И. // Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук. 1975. Вып. 2. № 4. С. 139–149.
20. Narang S. A. // Tetrahedron. 1983. V. 39. № 1. P. 3–22.
21. Ivanovskaya M. G., Gottikh M. B., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 5. P. 913–934.

22. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова Э. А. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1063–1067.
23. Кирби А., Уорен С. Органическая химия фосфора. М.: Мир, 1971. С. 1–403.
24. Корана Г. Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты. М.: Мир, 1964. С. 1–166.

Поступила в редакцию
26.IV.1989
После доработки
31.VII.1989

S. A. KUSNETSOVA, M. G. IVANOVSKAYA, Z. A. SHABAROVA

**CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS. IX.
DIRECTED INTRODUCTION OF SUBSTITUTED PYROPHOSPHATE
BONDS INTO DNA STRUCTURE**

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University

An effective synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing a substituted pyrophosphate bond in the definite position of the sugar-phosphate backbone has been developed by template-directed condensation of two heptanucleotides. One of them containing 5'-phosphate group to be activated and 3'-phosphate group of the other being substituted with ethoxy-, butylamino-, morpholino- or ethyl glycinate residues.

Water-soluble carbodiimide (EDAC) proved to be more efficient in the phosphate group activation than N-hydroxybenzotriazole ester, (yields of substituted pyrophosphates 35–80 and 10–15% respectively). The substituted pyrophosphate bond is quite stable in neutral aqueous solution. Mild conditions of selective cleavage of this bond yielding the initial oligonucleotides were found.