



УДК 577.113.4

© 1990 г.

*Н. Г. Долиная, А. В. Цытович, С. Г. Тевоян,
В. Н. Сергеев, З. А. Шабарова*

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

XI*. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ КИНЕТИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ХИМИЧЕСКОГО ЛИГИРОВАНИЯ В МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-ДУПЛЕКСАХ И СТРУКТУРОЙ РЕАКЦИОННОГО УЗЛА

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

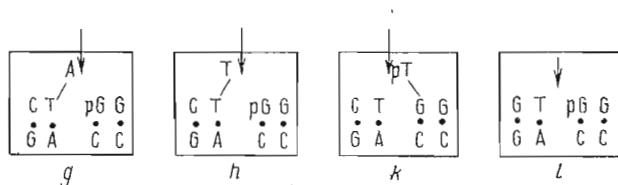
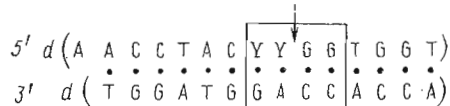
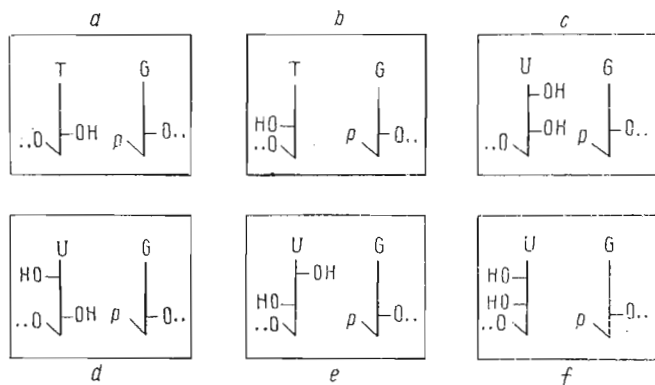
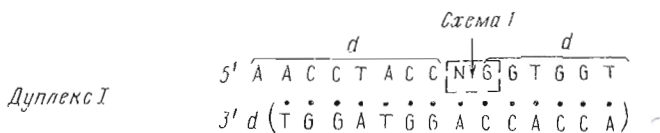
Для характеристики структурных факторов, влияющих на кинетические параметры химического лигирования, исследован набор ДНК-дуплексов с различным расположением реагирующих групп в участке «спивания». Модификации включали в себя замену дезокситимидинового звена на рибозидиновое, на нуклеозид с обращенной конфигурацией при атомах С2' и (или) С3'-фуранозы, причем модифицированные звенья могли быть как акцентором, так и донором фосфатной группы, введение «лишнего» нуклеотидного звена, замену G·C-пары, отстоящей на одно звено от места разрыва, на некомплементарную G·G-пару. Разработаны эффективные схемы спнзета модифицированных олигонуклеотидов; охарактеризована термическая устойчивость аномальных нуклеотидных дуплексов. На основании анализа кинетических параметров химического лигирования сделано предположение о конформации реакционного узла.

В предыдущей нашей работе [1] изложена структурно-кинетическая концепция химического лигирования (ХЛ). В рамках этой концепции предполагается, что кинетические параметры ХЛ, в частности отношение констант скоростей отдельных стадий реакции, $k_3/(k_2 + k_3)$, опосредованно обеспечат информацию о взаимной ориентации и степени сближения реагирующих групп в дуплексе, т. е. о локальной конформации участка, примыкающего к одноцепочечному разрыву. Ранее было показано, что указанное отношение кинетических констант в одном и том же дуплексе практически не зависит от строения конденсирующего реагента (использовался набор синтетических водорастворимых карбодимидов, различающихся природой заместителей при атомах N1 и N3) [1]. В настоящей работе изучены кинетические аспекты ХЛ в дуплексах с переменным реакционным узлом, причем использовали такие типы модификаций, которые меняли бы относительное расположение групп при сохранении их химической природы. Были сконструированы два семейства ДНК-дуплексов различной первичной структуры (схема 1).

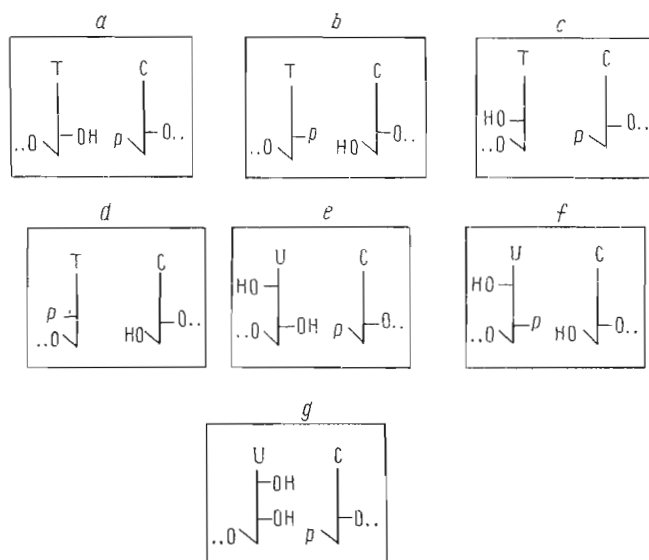
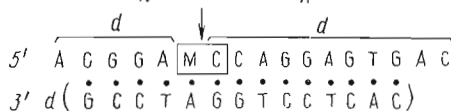
Модификации в месте одноцепочечного разрыва (указан на схеме стрелкой, в квадратах расшифрована структура) включали:

1) изменение положения фосфатной группы — 3'- или 5'-концевая (дуплексы IIa и IIb);

* Предыдущее сообщение см. [1]. Принятые сокращения: аU — 1-β-D-арабинофуранозилурацил; xU — 1-β-D-ксилофуранозилурацил; IU — 1-β-D-иксофуранозилурацил; dxT — 1-(β-D-2-дезокситреопентофуранозил)тимин; °U — O², 2'-эпигидроуридин; MES — 2-морфолинэтансульфокислота; P — [³²P]фосфат; DMAP — 4-N,N-диметиламинопиридин; ХЛ — химическое лигирование; CD1 — гидрхлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида; ФДЭ — фосфодиэстераза змеиного яда; ФМЭ — бактериальная щелочная фосфатаза.



Дуплекс II



где P — фосфатная группа.

2) замену 3'-концевого тимидина на рибоуридин (дуплексы Ic и IIд) или на нуклеозид с обращенной конфигурацией при атомах C2' и (или) C3' фуранозы, причем такое модифицированное звено могло быть как акцептором фосфатной группы (дуплексы Ib, Id — If, Ic и IIe), так и ее

донором (дуплексы II*d* и II*f*);

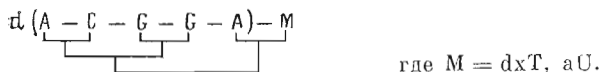
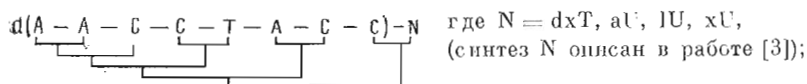
3) введение «лишнего» мономера пуриновой или пиримидиновой природы на донорном или акцепторном конце (дуплексы I*g* — I*k*);

4) замену G·C-пары, отстоящей на одно звено от места разрыва, на некомплементарную G·G-пару (дуплекс II).

Все использованные модификации можно условно разделить на два типа: 1) аномалии, данные о структурных особенностях которых внутри интактной двойной спирали имеются в литературе, например «лишнее» нуклеотидное звено, некомплементарная G·G-пара. Имеются также сведения о конформации рибонуклеотидных кластеров внутри двойной спирали; 2) замена донорных или акцепторных звеньев на нуклеотидные остатки с обращенной конфигурацией при C2'- или C3'-атомах фуранозы. Конформация таких звеньев в составе дуплексов практически не изучена.

Выбор нуклеотидной последовательности и места одноцепочечного разрыва дуплексов продиктован тем, что в их первичную структуру заложен участок узнавания эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*. Все перечисленные модификации либо затрагивают центральную A·T-пару участка узнавания, либо непосредственно примыкают к нему.

Олигонуклеотиды, компоненты дуплексов (I) и (II), содержащие только природные мономерные звенья, синтезировали по стандартным методам фосфотриэфирным блочным методом в растворе [2, 3]. В том случае, когда требовалось ввести на 3'-конец олигомера нуклеозидный остаток с обращенной конфигурацией у атомов C2' и (или) C3' фуранозы, также использовали блочный фосфотриэфирный метод. Нона- и гексануклеотиды собирали по схемам:



Модифицированные гексануклеотиды, содержащие 3'-концевую фосфатную группу, получали из предварительно синтезированных гептануклеотидов d(ACGGA)MrU, где M = dxT, aU, путем избирательного окисления рибозвена с последующим его β-элиминированием [4]. Целевые гептануклеотиды получали амидофосфитным твердофазным методом [5]. При этом использовали полимер с закрепленным на нем rU-звеном, к которому на первой стадии присоединяли фосфитное производное аномального нуклеозида.

После деблокирования олигонуклеотиды выделяли последовательно ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Первичную структуру олигомеров подтверждали методом Максама — Гилберта, нуклеозидный состав модифицированных гексануклеотидов — исчерпывающим гидролизом ФДЭ змеиного яда и ФМЭ с последующей ВЭЖХ [5]. В нонануклеотидах d(AACCTACC)rU и d(AACCTACC)lU с помощью периодатного окисления доказано наличие концевых *цис*-диольных группировок. В этих условиях окисление 3'-концевого звена в d(AACCTACC)xU не происходит.

Химическое лигирование в дуплексах (I) и (II) осуществляли, используя в качестве конденсирующего реагента хлоргидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида (CDI). Согласно проведенным кинетическим исследованиям [1], именно этот карбодимид из изученной серии оказался наиболее подходящим в матрично-направленных реакциях образования фосфодиэфирной связи. Предварительно были подобраны оптимальные условия ХЛ. За изменением концентрации веществ следили методом отбора проб: за превращением CDI — спектрофотометрически, с применением количественной цветной реакции на -N=C=N-группировку [6], за превра-

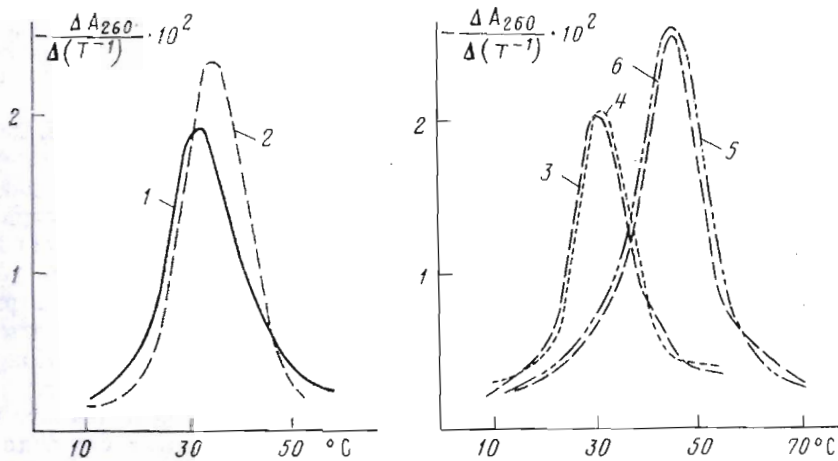


Рис. 1. Профили плавления в 50 mM MES-буфере, содержащем 0,02 M MgCl₂ (pH 6,0) (буфер А), олигонуклеотидных дуплексов: 1 — (Ic), 2 — (Ig), 3 — (Ib), 4 — (If), 5 — (IId), 6 — (IIf). Структура дуплексов приведена на схеме 1

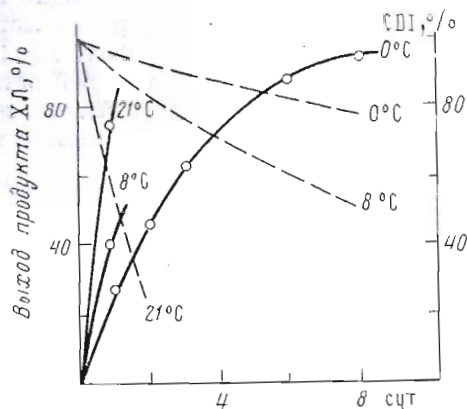


Рис. 2. Кривые накопления продукта ХЛ в дуплексе (IIa) (сплошные линии) и расхода СДІ (штриховые) при разных температурах. Условия: буфер А, нуклеотидная концентрация (на мономер) — 10⁻³ M, начальная концентрация СДІ — 0,2 M

щением олигонуклеотидов — электрофорезом в 20% ПААГ, используя ³²P-меченые олигонуклеотиды. При выборе температурного режима учитывали устойчивость дуплексов, температурную зависимость скорости образования фосфодиэфирной связи и кинетики гидратации реагента.

Для характеристики термической устойчивости дуплексов (I) и (II) снимали кривые температурной зависимости УФ-поглощения соответствующих олигонуклеотидных смесей в условиях ХЛ. Хотя дифференциальные кривые плавления дуплексов не имеют выраженного бифазного характера (см., например, рис. 1), как это наблюдалось при диссоциации дуплексов семейства (II), содержащих в месте «сшивания» некоплементарную пару или рибозвено [7], они, по-видимому, представляют собой суперпозицию двух близко расположенных кривых (первая ступень соответствует отделению от матрицы более слабо удерживаемого олигонуклеотида). Поэтому приведенные в табл. 1 значения т. пл. в определенном смысле условны. Тем не менее их анализ дает возможность оценить влияние модификации на устойчивость дуплекса. Так, обращение конфигурации заместителей при атомах С2' или С3' фуранозы имеет гораздо меньший дестабилизирующий эффект, чем замена канонической пары на неканоническую (ср. данные для дуплексов (Ia и II), (IIb, IId, IIe) и данные работы [7]). То же самое можно утверждать и для случая введения в место разрыва «лишнего» звена. Таким образом, все использованные модификации, за исключением некоплементарной G·G-пары (снижающей т. пл. двойной спирали на 10° С.), мало сказываются на устойчивости дуплексов (т. пл. дуплексов (I) ~33° С, дуплексов (II) 47° С).

В условиях устойчивости дуплексов выход продуктов ХЛ увеличивается пропорционально росту температуры, как это показано для дуплекса

Температура плавления дуплексов (I) и (II) в буфере А
Нуклеотидная концентрация (на мономер) $0,3 \cdot 10^{-3}$ М

Дуплекс (I)	a	b	c	d	e	f	g	h	k	l
Т. пл., °C±1	33	31	32	31	27	30	34	31	31	20
Дуплекс (II)	b		d		f					
Т. пл., °C±1	47		47		47					

Таблица 2

Результаты ферментативного и химического гидролиза продуктов ХЛ
в дуплексах (Ic–If)

Исходный дуплекс	Структура олигонуклеотида	Степень превращения при гидролизе, %		
		РНаза А	РНаза Т ₂	0,3 н. NaOH
Ic	d(AACCTACC)rUd(GGTGGT)	30	40	100
If	d(AACCTACC)lUd(GGTGGT)	0	—	100
Id	d(AACCTACC)aUd(GGTGGT)	0	—	0
Ie	d(AACCTACC)xUd(GGTGGT)	0	—	0
	d(AAAUUU) *	100	100	100

* Гексарибонуклеотид использован как контроль.

(IIa) на рис. 2. Однако при этом растет и скорость гидратации CDI. Оптимальная температура 10° С, 50 мМ MES-буфер, рН 6,0, с 0,02 М MgCl₂ (буфер А); концентрация карбодимиды 0,2—0,3 М. При использовании более концентрированных растворов наблюдается заметная модификация олигонуклеотидов.

В подобранных оптимальных условиях ХЛ идет во всех изученных системах, но с разной эффективностью (см., например, рис. 3 и 4). Что касается модификации карбодимидом олигонуклеотидов, выражающейся в появлении дополнительных полос на электрофореграммах, то в случае дуплексов семейства (II) ее почти не наблюдалось (рис. 4). В случае дуплексов семейства (I), как было показано в дополнительных экспериментах, количество продуктов модификации не превышало 5—10% за 7 сут реакции, причем модификации подвергались в основном 5'-концевые звенья гексануклеотида d(GGTGGT). Так как ошибка определения кинетических констант превышает в большинстве случаев 10%, CDI-модификацией при расчетах пренебрегали (дуплексы II) или суммировали выход продукта ХЛ и модифицированных продуктов (дуплексы I). В последнем случае не наблюдалось существенного изменения значений $k_3/(k_2 + k_3)$ по сравнению с вычисленными без учета модификаций.

Прежде чем анализировать кинетические закономерности, приведем данные, подтверждающие строение полученных путем ХЛ олигонуклеотидов. Первичная структура 15—17-звенных олигомеров, не содержащих аномальных нуклеотидов, подтверждена анализом по Максому — Гилберту.

Природа связи, образующейся с участием рибозвена, а также aU, lU, xU, была доказана щелочным и ферментативным гидролизом (РНазами А и Т₂) соответствующих продуктов ХЛ. Условия гидролиза подобраны таким образом, чтобы реперный рибоолигонуклеотид r(AAAUUU) гидролизировался полностью до тетраонуклеотида r(AAAU) (РНаза А) или мононуклеотидов (РНаза Т₂). Результаты гидролиза продуктов реакции в дуплексах (Ic — If) РНазой А приведены на рис. 5, остальные данные све-

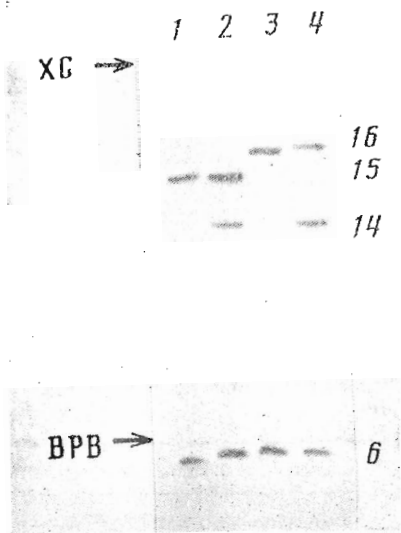


Рис. 3

Рис. 3. Радиоавтограф электрофореграммы (20% ПААГ) реакционных смесей, содержащих дуплексы (II) (1), (Ia) (2), (Iг) (3), (Ih) (4), после 4 сут инкубации в буфере А при 10° С, начальная концентрация CDI 0,3 М. 5'-³²Р-метку содержал гексануклеотид d(pGGTGGT). Стрелками указано положение маркеров-красителей бромфенолового синего (ВРВ) и ксиленианола ГГ (ХС), цифры сбоку обозначают длину олигонуклеотида. В смесях 2 и 4 содержится также 5'-³²Р-меченый 14-звенный олигонуклеотид-матрица

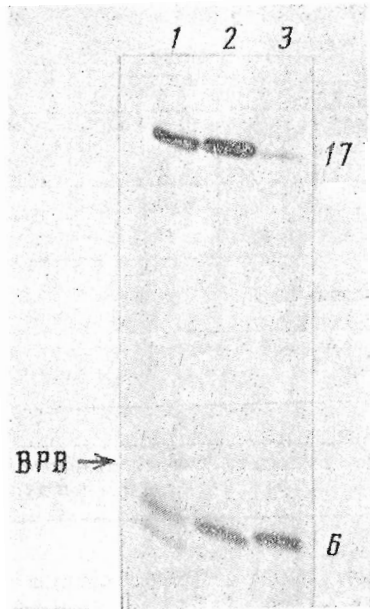


Рис. 4

Рис. 4. Радиоавтограф электрофореграммы (20% ПААГ) реакционных смесей, содержащих дуплексы (IIf) (1), (IIb) (2) и (IId) (3) после 3 сут инкубации в буфере А при 10° С, начальная концентрация CDI 0,2 М. 5'-³²Р-метку содержал гексануклеотид d(pACGGA)Mр. Другие обозначения как на рис. 3

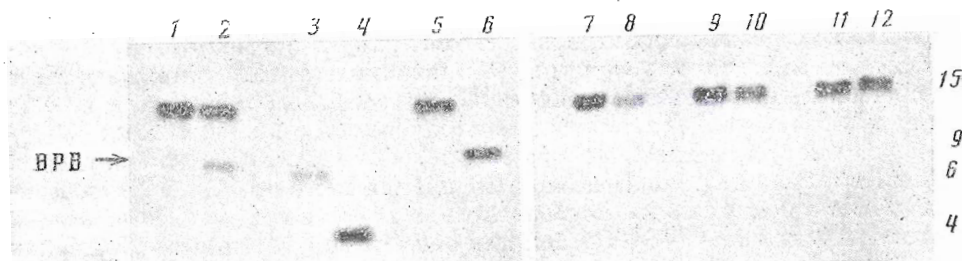
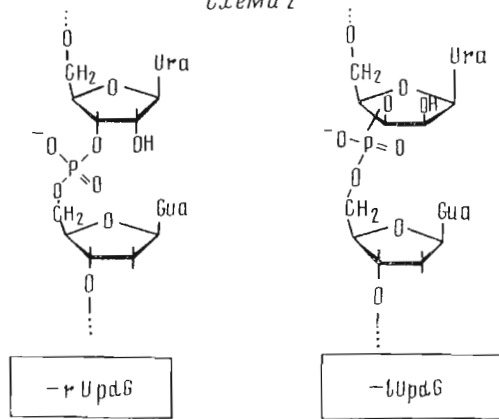


Рис. 5. Радиоавтограф электрофореграммы (20% ПААГ) олигонуклеотидов: полученного ХЛ d(AACCTACC)rUpd(GGTGGT) (1, 2), контрольного r(pAAAUUU) (3, 4), полученного ферментативным лигированием d(AACCTACC)rUpd(GGTGGT) (5, 6), полученных ХЛ d(AACCTACC)xUpd(GGTGGT) (7, 8), d(AACCTACC)aUpd(GGTGGT) (9, 10) и d(AACCTACC)lUpd(GGTGGT) (11, 12), до (нечетные дорожки) и после (четные дорожки) обработки РНазой А. Обозначения как на рис. 3, условия реакции см. «Экспер. части»

дены в табл. 2. Наличие в олигонуклеотидах d(AACCTACC)rUd(GGTGGT) и d(AACCTACC)lUd(GGTGGT) урацилсодержащих нуклеозидов, имеющих в углеводном фрагменте цис-диольную группировку, доказано полным гидролизом вещества щелочью до соответствующих гекса- и нонану-клеотидов. Гидролизуемые межнуклеотидные связи приведены на схеме 2:

Схема 2



Для простоты представлены только изомеры с 3'-5'-фосфодиэфирной межнуклеотидной связью; реальные продукты ХЛ представляют собой смесь 2'- и 3'-изомеров (для соединений, содержащих (rUpdG)-фрагмент, соотношение изомеров определено, см. ниже). В олигонуклеотидах, содержащих aU и xU в месте соединения олигомерных блоков, *цис*-диольная группировка отсутствует, поэтому они в этих условиях щелочью не гидролизуются (табл. 2).

Известно, что рибонуклеазы катализируют расщепление только природной 3'-5'-межнуклеотидной связи. Действительно, продукт ферментативного лигирования в дуплексе (Ic), содержащий фосфодиэфирную связь между rU и dG, полностью гидролизуются рибонуклеазами до исходных нона- и гексануклеотидов (см., например, рис. 5, колонки 5 и 6). В то же время продукт ХЛ в том же дуплексе гидролизуются этими же ферментами на 30—40% (табл. 2), т. е. доля образовавшегося в результате ХЛ соединения с природной межнуклеотидной связью составляет ~40%. Ранее теми же методами [7] было показано, что продукт ХЛ в дуплексе (IIg) также представляет собой смесь изомеров, однако в этом случае между рибо- и дезоксирибонуклеотидными звеньями практически исключительно (на 87%) образуется природная 3'-5'-фосфодиэфирная связь.

Олигонуклеотиды (Id — If) (табл. 2) не являются субстратами РНазы А, что указывает на наличие в них связей не природного типа. Для более строгого доказательства характера аномальных связей соответствующие продукты ХЛ были подвергнуты действию ФДЭ змеиного яда. Согласно литературным данным [8], этот фермент более медленно расщепляет связи, образованные нуклеотидными остатками, один из которых аномален, причем максимальное замедление наблюдается в случае олигомера, содержащего dxT. На рис. 6 в качестве примера приведены результаты обработки d(ACGGAxTCCAGGAGTGAC) ФДЭ змеиного яда. Видно, что наряду с продуктами полного гидролиза вещества — смеси мононуклеотидов образуется олигомер, соответствующий по длине d(ACGGAxTC), т. е. модифицированная связь расщепляется медленнее, чем остальные фосфодиэфирные связи. В случае олигонуклеотидов, содержащих aU, lU и xU, замедление гидролиза менее заметно. Первичная структура продуктов ХЛ в дуплексах (IIId) и (IIIf) была подтверждена анализом по Максаму — Гилберту.

Проанализируем теперь кинетические параметры ХЛ в дуплексах семейств (I) и (II). Линейные анаморфозы кинетических кривых (согласно уравнению, приведенному в работе [1]) представлены на рис. 7 и 8. По тангенсу угла наклона прямых на этих графиках по формуле

$$\frac{k_3}{k_2 + k_3} = \frac{k_4}{k_1} \operatorname{tg} \alpha$$

вычислены соотношения констант $k_3/(k_2 + k_3)$ (табл. 3); значения k_4 определены в независимых опытах, значения k_1 — с помощью модельных систем [1, 6].

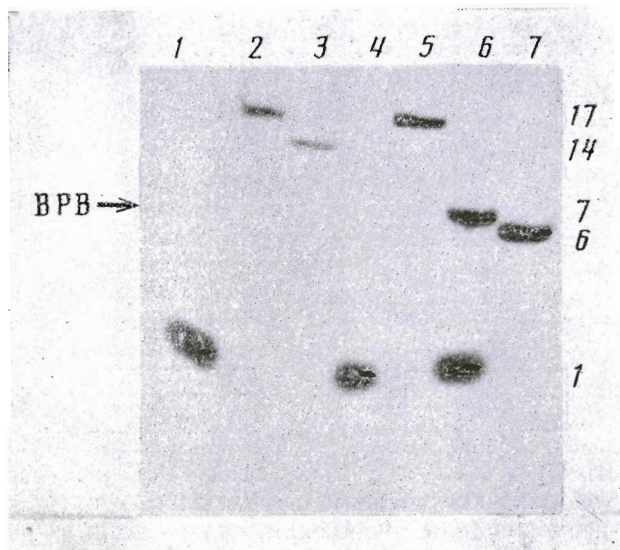


Рис. 6. Радиоавтограф электрофореграммы (20% ПААГ) $5'$ - ^{32}P -меченых олигонуклеотидов $d(\text{pACGGA})_n\text{Ud}(\text{CCAGGAGTGAC})$, $d(\text{pACCA}\cdot\text{CCAGGTAGGT})$, $d(\text{pACGGAxTCCAGGAGTGAC})$ до (2, 3, 5) и после (1, 4, 6) обработки ФДЭ змеиного яда. Дорожка 7 — контрольный гексануклеотид $d(\text{pACGGAxT})$. Обозначения как на рис. 3. Условия реакции см. в «Экспер. части»

Видно, что для различных дуплексов величина соотношения констант сильно варьирует. Очевидно, что численное значение этого параметра нельзя однозначно соотносить с конкретной структурой узла. Однако, анализируя совокупность данных для серии систем, можно получить и нетри-

Таблица 3

Кинетические параметры реакций ХЛ в дуплексах (I) и (II)
Условия см. в «Экспер. части»

Дуплекс (I)	Узел «сшиваний»	Выход продукта ХЛ, % (6 сут) *	$\frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot 10^3$
a	-dT ⁺ pdG-	69	4,75±0,28
b	-dxT ⁺ pdG-	28	1,27±0,16
c	-rU ⁺ pdG-	36	1,75±0,54 **
d	-aU ⁺ pdG-	5	—
e	-xU ⁺ pdG-	5	—
f	-IU ⁺ pdG-	5	—
g	-d(TA) ⁺ pdG-	48	2,35±0,80
h	-d(TT) ⁺ pdG-	45	2,15±0,48
k	-dT ⁺ pd(TG)-	37	1,76±0,40
l	-d(GT) ⁺ pdG-	67	4,12±0,41
<hr/>			
Дуплекс (II)			
a	-dT ⁺ pdC-	80	18,5±0,9
b	-dTp ⁺ dC-	92	25,8±8,0
c	-dxT ⁺ pdC-	12	0,72±0,22
d	-dxTp ⁺ dC-	18	1,02±0,38
e	-aU ⁺ pdC-	23	1,39±0,48
f	-aUp ⁺ dC-	75	8,2±2,0
g	rU ⁺ pdC- **	24	2,93±0,45 ***

* ХЛ в дуплексах (IIa, b, g) проводилось при 0° С, в остальных дуплексах — при 10° С.

** Под k_3 здесь подразумевается суммарная константа скорости образования 3'-5'- и 2'-5'-фосфоэфирных связей.

*** Отношение кинетических констант вычислено на основании данных работы [7].

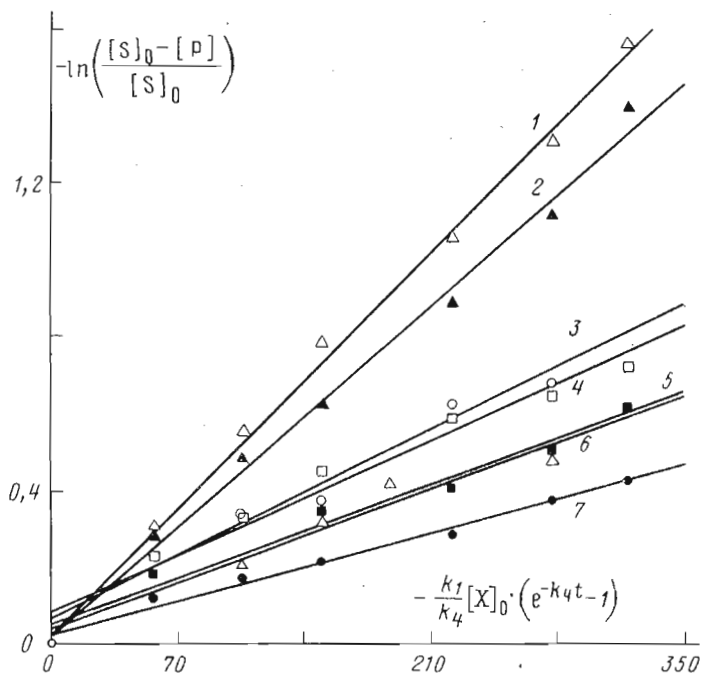


Рис. 7. Линейные анаморфозы кривых накопления продукта ХЛ (P) в дуплексах (S) (Ia) (1), (II) (2), (Iг) (3), (IIh) (4), (Ic) (5), (Ik) (6), (Ib) (7). Условия реакции см. в «Экспер. части»

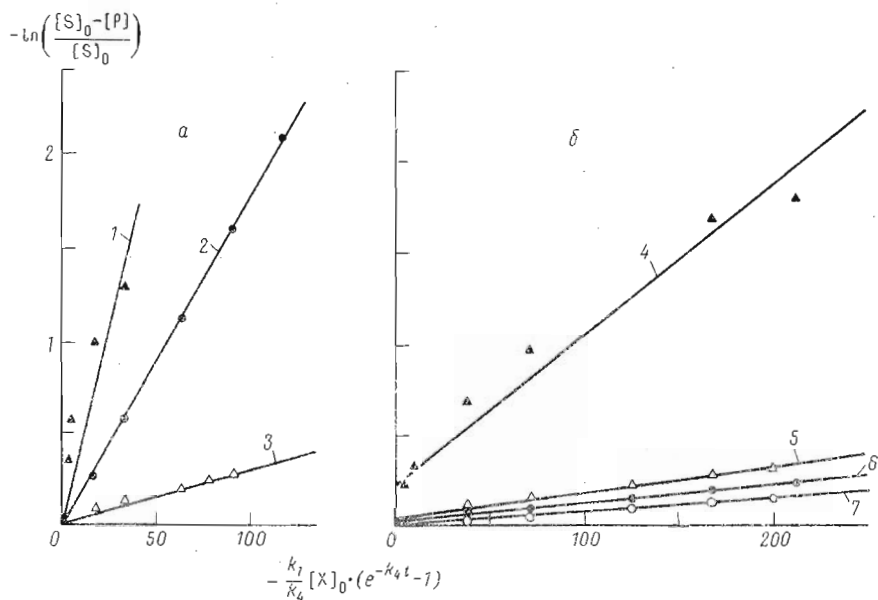


Рис. 8. Линейные анаморфозы кривых накопления продукта ХЛ в дуплексах (IIb) (I), (IIa) (2), (IIг) (3) при 0° С (a) и в (IIf) (4), (IIe) (5), (IId) (6), (IIc) (7) при 10° С (б). Условия реакции см. в «Экспер. части»

виальную информацию о влиянии разных модификаций на локальную структуру двойной спирали. Попробуем проиллюстрировать это на ряде примеров.

Сравним дуплексы (Ia) и (II); величины $k_3/(k_2 + k_3)$ для них практически совпадают (табл. 3). Полученный результат свидетельствует о том, что искажение структуры, вызываемое G·G-парой, не влияет на ориентацию реагирующих групп соседнего звена и, следовательно, носит локальный характер. Этот вывод не противоречит литературным данным о сте-

пени влияния G·G-пар на физико-химические параметры олигонуклеотидных дуплексов [9].

Лишнее нуклеотидное звено снижает эффективность и скорость химической реакции; величина $k_3/(k_2 + k_3)$ в дуплексах (I_g — I_k) падает в 2 раза по сравнению с немодифицированным дуплексом. Здесь, по-видимому, сказывается влияние двух факторов: «лишнее» звено меняет расстояние между фосфатной и гидроксильной группами, одновременно искажается структура двойной спирали. Согласно литературным данным, «лишнее» адениновое [10] или тиминное [11] основание интегрируется в двойную спираль. Можно предположить, что наличие одноцепочечного разрыва в месте дефекта увеличивает степень свободы неспаренного звена и оно частично «выпячивается» из спирали. Если «лишнее» звено — донор фосфата (дуплекс I_k), появляется дополнительный фактор, снижающий эффективность ХЛ. Активированное производное оказывается в меньшей степени защищенным дуплексом от атаки водой.

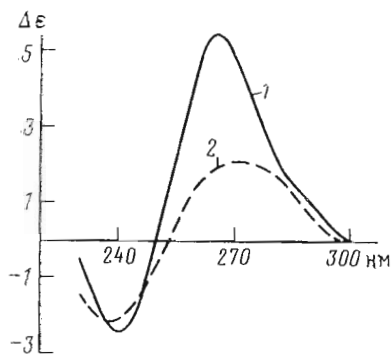
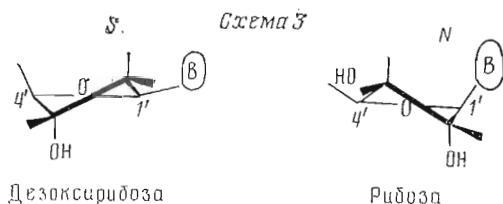


Рис. 9. Спектры КД ДНК-дуплексов (Ia) (1) и (IIa) (2) в буфере А при 20° С

Важно и нетривиально то обстоятельство, что параметры ХЛ для немодифицированных дуплексов (Ia) и (IIa) различаются. Это может объясняться как различиями в природе соединяемых звеньев: Т и G — в дуплексе (Ia), Т и С — в дуплексе (IIa) (подобная зависимость эффективности ХЛ отмечалась ранее [12]), так и разной вторичной структурой дуплексов (I) и (II). Предположение о наличии в структуре дуплексов семейства (I) элементов А-формы было сделано на основании анализа спектров КД (рис. 9) и литературных данных [13].

Связано ли с наличием элементов А-формы то обстоятельство, что эффективность ХЛ в дуплексе (Ia) ниже, чем в дуплексе (IIa)? Расчетным путем показано, что доступность атомов кислорода фосфатных групп растворителю (и конденсирующему реагенту) в А-форме почти вдвое меньше, чем в В-форме [14]. Это должно существенно влиять на значение константы k_1 (в принятом нами приближении k_1 принимается постоянным для всех изученных комбинаций контактов). Форма спирали должна также сказываться и на отношении констант $k_3/(k_2 + k_3)$.

Проанализируем данные по лигированию узлов, в которых дезокси тимидин на акцепторном конце заменен на рибоуридин (дуплексы (Ic) и (II_g)). В обоих случаях эффективность ХЛ заметно падает по сравнению с немодифицированным дуплексом (табл. 3). Можно предположить, что это связано с резким изменением конформации 3'-концевого звена. Известно, что для В-ДНК характерна С2'-эндо-(S)-конформация фуранозных циклов с аксиальным положением 3'-гидроксигруппы (схема 3). В то же



время в гибридном дуплексе, в состав которого входят ковалентно связанные РНК- и ДНК-блоки, рибонуклеотидные звенья ввиду своего структурного консерватизма сохраняют С2'-эндо-(N)-конформацию (характерную для А-формы) [15]. При этом 3'-гидроксильная группа занимает экваториальное положение, что может стерически затруднять ее взаимодействие

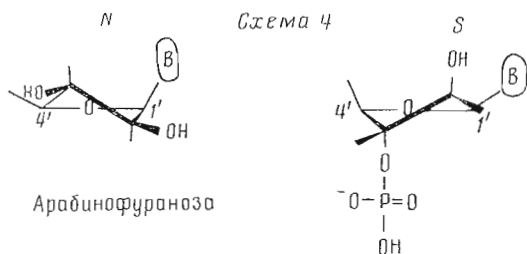
с фосфатной группой соседней молекулы. Отсюда следует, что ХЛ в нуклеотидном дуплексе, имеющем А-форму спирали, будет гораздо менее эффективно, чем в В-ДНК. Это предсказание было подтверждено в ряде экспериментов с синтетическими фрагментами РНК, выполненными в нашей лаборатории [16].

Структурную неравноценность дуплексов (I) и (II) отражает тот факт, что относительное (по сравнению с немодифицированным дуплексом) уменьшение эффективности ХЛ различно для двух типов дуплексов — (Ic) и (IIg) (табл. 3). Различно и процентное содержание 3'-5'- и 2'-5'-связанных изомеров. Продукт ХЛ в дуплексе (IIg) содержит 87% природной 3'-5'-фосфодизэфирной связи в «сшитом» узле, но относительная эффективность лигирования ниже, чем в дуплексе (Ic), зато в последнем увеличивается доля 2'-5'-связанного изомера (60—70%). Очевидно, что активированный фосфат находится в различной позиции по отношению к 3'- и 2'-гидроксилам в двух семействах дуплексов.

Рассмотрим теперь дуплексы, содержащие нуклеотидные остатки с обращенной конфигурацией при атомах С2' и (или) С3' фуранозы. Сравним сначала кинетические параметры ХЛ в дуплексах (Ib), (Id) — (If). Как видно из табл. 3, наличие на акцепторном конце аномального нуклеозида (dхТ, аU, IU и хU) заметно снижает эффективность ХЛ. Для дуплексов (Id) — (If) даже не удалось получить кинетических характеристик (максимальный выход продукта не превышает 5%). Очевидно, что низкая эффективность реакции в дуплексе обусловлена неблагоприятной конформацией реагирующих звеньев.

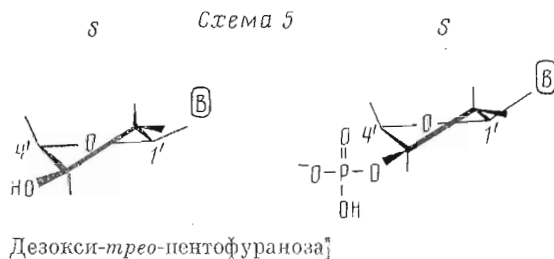
Остановимся подробнее на данных, полученных для арабинозилсодержащих систем. В случае дуплексов серии (II), для которых получены количественные характеристики реакции, наблюдалась аналогичная закономерность: значение $k_3/(k_2 + k_3)$ для дуплекса (IIe) с аU-звеном в акцепторном участке на порядок ниже, чем для немодифицированного дуплекса (IIa) (табл. 3). В то же время, когда арабинопроизводное является донором фосфатной группы (дуплекс (If), содержащий фрагмент раUр), значение $k_3/(k_2 + k_3)$ сравнимо с таковым для немодифицированного дуплекса (IIb) (табл. 3). На основании полученных данных можно предположить, что конформация аномального звена, примыкающего к одноцепочечному разрыву, различается в зависимости от того, содержит ли оно 3'-фосфатную группу.

Из литературы известно, что в отличие от природных мономеров для арабиносодержащих нуклеотидов характерна четко выраженная доминирующая конформация фуранозного цикла в зависимости от положения фосфатной группы: для 5'раА предпочтительнее *N*-тип, для 3'аАр — *S*-тип [17]. Эта закономерность сохраняется на олигомерном уровне. Так, динуклеозидфосфат аАраА является смешанным *S-N*-конформером (аАр-фрагмент имеет *S*-конформацию, а раА-фрагмент — *N*-конформацию), исследование тримера аАраАраА позволило описать его как *S-S-N*-конформер [17]. Опираясь на результаты ХЛ и литературные данные, можно с высокой вероятностью постулировать для раU-звена дуплексов (Id) и (IIe) конформацию *N*-типа с экваториальным расположением 3'-гидроксильной группы (схема 4). В том случае, когда арабинопроизводное является донором фосфатной группы (дуплекс IIf), конформация аномальной фуранозы меняется с *N* на *S*, что обуславливает оптимальное для взаимодействия аксиальное расположение реагирующей группы.



Из этих предположений следует, что в ДНК-дуплексе остатки арабинонуклеозидов сохраняют структурную автономию, т. е. существуют в конформации, которая характерна для них на мономерном или олигомерном уровне. Поскольку результаты ХЛ и данные ЯМР-спектроскопии ДНК-дуплексов, содержащих и не содержащих одноцепочечный разрыв [18], говорят в пользу по крайней мере частичной закрепленности конформации нуклеотидных остатков в месте разрыва, можно предположить, что и в ковалентно непрерывных ДНК остатки арабинонуклеозидов будут находиться в *S*-конформации. Такое предположение не противоречит данным, полученным в работе [19], по расщеплению *EcoRI* ДНК-дуплексов, содержащих аА-звено в гидролизуемом участке. Модифицированный дуплекс расщепляется ферментом медленнее, чем контрольный, однако со сравнимой скоростью, в то время как расщепления дуплекса, содержащего в той же позиции гА, не наблюдается вовсе. Авторы предполагают, что в последнем случае ингибирование гидролиза связано с тем, что в участке расщепления соседствуют звенья с *N*-конформацией, характерной для гА, и с *S*-конформацией, свойственной дезокси-*treo*-пентонуклеотидным остаткам. В то же время аА в составе фрагмента -dGpaApdA имеет *S*-конформацию, т. е. участок расщепления остается как бы немодифицированным (соседство *S-S*-конформаций).

Другие кинетические закономерности наблюдаются для дуплексов (IIc и IIд), содержащих производные дезокси-*treo*-пентофуранозы. Эффективность ХЛ меняется незначительно при варьировании положения фосфатного остатка в узле «сшивания». Кроме того, она в обоих случаях значительно ниже, чем для немодифицированного дуплекса (табл. 3). Это может указывать на сохранение одной и той же конформации 3'-концевого звена, неблагоприятной для лигирования, либо на стерические затруднения, связанные с обращением 3'-гидроксила. Поскольку в литературе нет данных о конформации дезокси-*treo*-пентофуранозидов или их фосфатов, для проверки наших предположений мы решили прибегнуть к анализу молекулярных моделей этих соединений. Анализ показал, что пространственно незатрудненной для dхТ и его 3'-фосфата является *S*-конформация (схема 5), в *N*-конформации происходит стерически невыгодное сближение заместителя при С3', расположенного над плоскостью сахарного кольца и гидроксильной группой, связанной с атомом С5', а также с гетероциклическим основанием. *S*-Конформация для 3'-концевых звеньев -dхТ и -dхТр, находящихся в месте одноцепочечного разрыва, обуславливает экваториальное расположение реагирующей группы (гидроксильной или фосфатной), что, как уже отмечалось, неблагоприятно сказывается на эффективности ХЛ.



Метод ХЛ, использованный в настоящей работе для определения локальной структуры ДНК, в некотором смысле сходен с ферментативным [19]. Только в отличие от эндонуклеаз рестрикции, катализирующих расщепление ДНК в строго определенном месте, под действием конденсирующего реагента происходит «сшивание» любых нуклеотидных звеньев в месте одноцепочечного разрыва. На наш взгляд, ХЛ более объективный метод анализа структуры, чем ферментативный, поскольку собственно конформационный аспект реакции ХЛ проще отделить от прочих влияющих факторов. Различные конформационные изменения в месте разрыва, отражаясь в разной степени на эффективности реакции, тем не менее не

блокируют ее полностью. Разрабатываемый подход, дополняя традиционные физико-химические методы и теоретический конформационный анализ, позволяет более надежно оценить конформацию остатков при одноцепочечном разрыве и даже «внутри» интактной двойной спирали.

Изучение взаимосвязи между кинетическими параметрами ХЛ и локальной структурой нуклеотидных дуплексов имеет принципиальное значение для дальнейшей разработки метода как в теоретическом, так и в прикладном плане. Во-первых, это связано с расширением наших представлений об особенностях реакций в пространственно организованных комплексах, стабилизированных слабыми многоточечными взаимодействиями, о степени заторможенности реагирующих групп в них; с совершенствованием кинетических подходов к описанию такого рода энзимоподобных реакций и др. Во-вторых, такой подход позволяет оценить перспективы введения той или иной модификации в сахарофосфатный остов ДНК путем ХЛ, оценить уровень селективности реакций с участием полифункциональных звеньев (например, рибопроизводных), открывает путь к химическому зондированию тонкой структуры нуклеотидных дуплексов.

Экспериментальная часть

В работе использовали нуклеозиды отечественного производства; N-метилимидазол, DMAP, MeOTrCl , MES, трис, пиперидин, CDI, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, ФРГ); дитиотреит, бромфеноловый синий, ксиленицианол FF, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония (Serva, ФРГ); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с удельной радиоактивностью 1000 Ки/ммоль — коммерческий препарат ВО «Изотоп» (СССР); ферменты: Т4-полинуклеотидкиназа (НИКТИ БАВ, Бердск); ФДЭ и ФМЭ (Worthington Biochemical Corp., США); Т4-ДНК-лигазу (15 000 ед. акт./мл, НПО «Фермент», Вильнюс); РНазу А (60 ед. акт./мл, Reanal, ЧСФР); РНазу Т2 (2,5 ед. акт./мл, Sankyo, Япония).

Использованы следующие буферные растворы: 0,05 М MES (рН, 6,0), 0,02 М MgCl_2 (А); 0,05 М трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA (Б); 100 мМ трис-НСл (рН 7,3) (В); 20 мМ ацетат аммония (рН 4,5), 2 мМ EDTA (Г); 0,04 М NH_4HCO_3 , 0,02 М MgCl_2 , рН 8,5 (Д).

Нуклеозиды с обращенной конфигурацией при атомах С2' и(или) С3' получали из соответствующих природных нуклеозидов через ангидропроизводные [3]. xU был любезно предоставлен И. А. Михайлопуло (Институт биоорганической химии АН БССР). Введение защитных групп проводили по стандартным методикам. При фосфитилировании $(\text{MeOTr})_x\text{T}$ и $(\text{MeOTr})_x\text{U}$ время реакции было увеличено по сравнению с немодифицированными нуклеозидами до 5 и 24 ч соответственно. Синтез фосфитного производного $(\text{MeOTr})_x\text{U}$ проводили в гетерогенном варианте из-за плохой растворимости исходного вещества в ацетонитриле (методику см. [5]). Динуклеозидфосфаты, содержащие модифицированные звенья на 3'-конце, получали стандартным фосфотриэфирным методом, увеличив избыток производных аномальных нуклеозидов до двукратного по отношению к нуклеотиду.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ олигонуклеотидов проводили на приборе Altex (США) (носитель — Лихросорб С-18 (10 мкм; Merck, ФРГ), размер колонки 4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации (0—40%) ацетонитрила в 0,05 М ацетате аммония. Скорость элюции 1 мл/мин.

Электрофорез проводили в 20% плоском ПААГ толщиной 0,4 мм в присутствии 7 М мочевины в буфере Б при постоянном напряжении 1000 В. Определение радиоактивности зон и элюцию олигонуклеотидов из геля осуществляли по стандартным методикам [1].

Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически. Коэффициент молярного поглощения аномальных нуклеотидных звеньев, ϵ_{260} , принимали равным ϵ_{260} их природных аналогов. Оптические измерения делали на спектрофотометре Spectronic-2000 (Bauch and Lomb, США). Температурную зависимость УФ-поглощения эквимольных смесей олигонуклеотидов в буфере А изучали на спектрофотометре Cary-219

(Varian, США), оснащенном термостатированным кюветодержателем. Скорость изменения температуры 0,5° С/мин. Кривые плавления представлены в дифференциальной форме. За т. пл. дуплексы принимали температуру в максимуме дифференциальной кривой.

Ферментативное лигирование в дуплексах (I) и (II) под действием Т4-ДНК-лигазы проводили как в работе [20].

Индукцируемое СДИ химическое лигирование осуществляли в буфере А в темноте; температура инкубации 0° С для дуплексов (IIa, IIb, IIg), 10° С — для всех остальных. Нуклеотидная концентрация (на мономер) 10⁻³ М, ³²Р-меченные компоненты брали в 1,5-кратном недостатке. Концентрацию СДИ варьировали в разных экспериментах: для дуплексов (Ia—II) — 0,3 М, для дуплексов (IIa — IIg) — 0,2 М. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты реакционных смесей, нуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне и анализировали электрофорезом в ПААГ.

Гидролиз продуктов ХЛ щелочью. ³²Р-Меченый олигонуклеотид обрабатывали 3 ч 0,3 н. NaOH при 37° С. Затем реакционную смесь нейтрализовали 40% водным раствором уксусной кислоты, нуклеотидный материал осаждали и анализировали электрофорезом в ПААГ.

Гидролиз продуктов химического и ферментативного лигирования РНазами А и Т₂ проводили в течение 1,5 ч при 37° С в буфере В или Г соответственно. Гидролизат анализировали электрофорезом в ПААГ.

Гидролиз продуктов химического и ферментативного лигирования ФДЭ змеиного яда и ФМЭ проводили в течение 3 ч при 37° С в буфере Д. Гидролизат анализировали электрофорезом в ПААГ.

Статистическую обработку данных осуществляли по методу наименьших квадратов.

Авторы выражают благодарность Н. И. Соколовой и Т. С. Орецкой за помощь при синтезе модифицированных олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долинная Н. Г., Цытович А. В., Сергеев В. Н., Герцюк М. Н., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1183—1194.
2. Грязнова О. И., Долинная Н. Г., Исагуляну М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 124—132.
3. Цытович А. В., Орецкая Т. С., Долинная Н. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Химия природы. 1987. № 3. С. 421—425.
4. Крынецкая Н. Ф., Заюкина Г. В., Oretskaya T. S., Volkov E. M., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 1. P. 33—43.
5. Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орецкая Т. С., Потапов В. И., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 18. С. 1034—1039.
6. Герцюк М. Н., Сергеев В. Н., Цытович А. В., Долинная Н. Г., Кухарь В. П. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1268—1276.
7. Dolinnaya N. G., Sokolova N. I., Gryaznova O. I., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 3721—3738.
8. Соколова Н. И., Крынецкая Н. Ф., Суханова Л. Л., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 379—385.
9. Werniges H., Steger G., Riesner D., Fritz H.-J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 9. P. 3773—3790.
10. Roy S., Sklenar V., Appella E., Cohen J. S. // Biopolymers. 1987. V. 26. № 12. P. 2041—2052.
11. Van den Hoogen Y. T., van Beuzekom A. A., van den Elst H., van der Marel G. A., van Boom J. H., Altona C. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 7. P. 2971—2986.
12. Шабарова З. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Пурмаль А. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 628—642.
13. Кузнецова С. А., Кубарева Е. А., Орецкая Т. С., Долинная Н. Г., Крынецкая Н. Ф., Громова Е. С., Шабарова З. А., Цех Д. // Биопол. и клетка. 1987. Т. 3. № 6. С. 283—289.
14. Зенгер В. // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот // Ред. Вайнштейн Б. К. М.: Мир, 1987. С. 398—402.
15. Melleta J.-R., Haasnoot C. A. G., van der Marel G. A., Wille G., van Boeckel C. A. A., van Boom J. H., Altona C. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 16. P. 5717—5738.
16. Долинная Н. Г., Аширбекова Д. Т., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1346—1355.

17. Doornbos J., Barascut J.-L., Lazrek H., Imbach J.-L., van Westrenen J., Visser G. M., van Boom J. H., Altona C. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 13. P. 4583—4600.
18. Pieters J. M. L., Mans R. M. W., van den Elst H., van der Marel G. A., van Boom J. H., Altona C. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4551—4565.
19. Ohtsuka E., Ishino Y., Ibaraki K., Ikehara M. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. № 3. P. 447—450.
20. Цытович А. В., Долинная Н. Г., Шабарова З. А. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. Вып. 3. С. 690—699.

Поступила в редакцию
30.X.1989

N. G. DOLINNAYA, A. V. TSYTOVICH, G. G. TEVOSYAN,
V. N. SERGEEV, Z. A. SHABAROVA

**CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE STRANDED NUCLEIC ACIDS.
XI. INTERCONNECTION BETWEEN KINETIC PARAMETERS AND
REACTIVE SITE CONFORMATION IN MODIFIED DNA DUPLEXES**

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

To characterize structural factors affecting kinetic parameters of chemical ligation, DNA duplexes with various arrangements of reacting groups in the ligation site have been synthesized and studied. The modifications included replacement of a deoxythymidine with a uridine or a nucleoside having reversed configuration at C2' and/or C3' atoms, the modified residue being phosphate donor or acceptor; introduction of an «extra» nucleotide residue; replacement of a G·C pair second to the junction with a noncomplementary G·G pair. Thermal stability of the anomalous nucleotide duplexes has been characterized. Based on analysis of the kinetic parameters of chemical ligation, a suggestion is made about the conformation of the reactive site.