

Компоненты изучаемой модели синтезированы амидофосфитным методом из цианэтиловых синтонов. При синтезе соединения (IIa) тиофосфатную группу вводили по завершении всех синтетических циклов по схеме, аналогичной описанной в работе [4]: еще не снятый с носителя 8-мер превратили в 5'-концевой Н-фосфонат, который подвергли силилированию триметилхлорсиланом и последующему окислению серой в абсолютном пиридине. После отделения от твердой фазы и N, Р-деблокирования тиофосфат (IIa) выделили с помощью денатурирующего гель-электрофореза с последующей очисткой обращенно-фазовой ВЭЖХ. Параллельно с соединением (IIa) был синтезирован 5'-фосфатный 8-мер (IIб) путем химического фосфорилирования по методу [5].

Лигирование модельных фрагментов (I) и (IIa, б) в комплементарном комплексе с соединением (III) проводили с помощью Т4-ДНК-лигазы в масштабе 20 нмоль каждого из олигомеров. Продукты лигазных реакций ($I + IIa = IVa$) и ($I + IIб = IVб$) были выделены электрофорезом в денатурирующих условиях, гомогенность каждого из них анализировалась обращенно-фазовой ВЭЖХ. Установлено, что продукт лигазной реакции с участием тиофосфата (IIa) содержал главный и минорный компоненты в соотношении, близком 6 : 1, причем минорный компонент обладал большей хроматографической подвижностью, идентичной подвижности немодифицированного 18-мера (IVб).

Каждый из выделенных продуктов лигирования был подвергнут энзиматическому расщеплению (SVPDE + BAP), а продукты расщепления, в свою очередь, — ВЭЖХ-анализу. Результаты проведенного анализа для немодифицированного соединения (IVб) и минорного продукта оказались одинаковыми: в обоих случаях соотношение С : G : A : T было близко к 6 : 1 : 1 : 10. При хроматографическом анализе компонентов гидролизата главного продукта лигирования ($I + IIa$) был выявлен негидролизированный динуклеозидтиофосфат Gr(S)A с временем удерживания на колонке, точно совпадающим с временем удерживания для R_p -стереомера [1, 3]. Кроме него обнаружены в незначительных количествах G и p(S)A, а также C и T (последние в соотношении 3 : 1). Динуклеозидтиофосфата с S_p -конфигурацией среди продуктов гидролиза не обнаружено, SVPDE-расщепление тиофосфатной двойки с R_p -конфигурацией сильно замедлено в сравнении с ее оксоаналогом, S_p -стереомер проявляет абсолютную устойчивость в отношении SVPDE [6]. Действительно, более продолжительные условия ферментативного гидролиза соединения (IVa) привели к исчезновению динуклеозидтиофосфата и возрастанию количества G и p(S)A. Нуклеотидная последовательность соединения (IVa) подтверждена на секвенировании по методу химической модификации. Характерная особенность поведения межнуклеотидного тиофосфата состоит в том, что при действии диметилсульфата с целью модификации по дезоксигуанозинovому звену он также подвергается метилированию, и образующаяся метилтиофосфатная группа в условиях пиперидиновой обработки способна расщепляться независимо от удаления метилгуанинового основания и последующего β -элиминирования. На это указывает присутствие дополнительных полос в колонке «модификация по G», располагающихся между полосами, соответствующими результатам расщепления по соседним G и A.

Из изложенных результатов анализа соединения (IVa) следует, что Т4-ДНК-лигаза вовлекает в сшивку прохиральную 5'-тиофосфатную группу и стереонаправленно создает межнуклеотидную тиофосфатную связь с R_p -конфигурацией. Однако образование двух продуктов лигазной реакции (IVa) и (IVб) не давало оснований для заключения об однозначности протекания активации 5'-тиофосфатной группы в активном центре Т4-ДНК-лигазы. Причины появления немодифицированного 18-мера в условиях нашего эксперимента могли быть обусловлены как присутствием в препарате 5'-тиофосфата (IIa) примеси 5'-оксофосфата (IIб), так и образованием на ферментативной стадии с участием АТР двух тиопирофосфатов, способных давать с гидроксильным компонентом тиофосфорильное и оксофосфорильное соединения.

Для того, чтобы исключить первую причину, мы подвергли препарат 5'-тиофосфата (IIa) обработке ВАР, принимая во внимание, что этот фермент гидролизует лишь моноэфиры фосфорной кислоты, в то время как моноэфир тиофосфорной кислоты устойчив к ее действию [7]. Количество дефосфорилированного соединения в обработанном ВАР образце 5'-тиофосфата (IIa) строго соответствовало количеству немодифицированного продукта сшивки (IVб), полученного с участием не обработанного ВАР препарата (IIa). Лигазная реакция с ВАР-обработанным тиофосфатом протекает исключительно с образованием соединения (IVa), и, следовательно, никаких превращений, связанных с утративанием атома серы, Т4-ДНК-лигаза с 5'-тиофосфатом не производит.

Таким образом, используя в качестве субстрата 5'-тиофосфатный аналог ДНК, Т4-ДНК-лигаза образует дуплекс с точечной тиофосфорильной модификацией в сахаро-фосфатном остове, причем атом серы в образовавшейся межнуклеотидной связке ориентирован в сторону большой бороздки двойной спирали.

Экспериментальная часть

В работе использованы Т4-ДНК-лигаза (выделена в лаборатории), SVPDE (Boehringer, ФРГ), ВАР (Amersham, США).

Химический синтез олигонуклеотидов выполнялся на автоматическом синтезаторе «System 1 plus» (Beckman, США) с использованием цианэтильных фосфорамидитных синтонов. Последние получены аналогично методу [8] и проанализированы обращенно-фазовой ВЭЖХ: колонка Ultrasphere ODS (4,6 × 250 мм), скорость элюции 1 мл/мин, градиент ацетонитрила от 50 до 100% в 0,1 М ТЕАА, pH 7,5, за 25 мин. Времена удерживания (мин) составили: для (DMTr)Tp(NPr₂ⁱ, CNEt) 23,2 и 24,5 для (DMTr)bz^oAp(NPr₂ⁱ, CNEt) 24,5 и 25,5, для (DMTr)bz^oCp(NPr₂ⁱ, CNEt) 26 и 27, для (DMTr)ib^oGp(NPr₂ⁱ, CNEt) 22,5 и 23,5.

Лигирование олигонуклеотидов проводили при 10° С в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 0,05 М трис-НСl (pH 7,5), 0,01 М MgCl₂, 0,01 М дитиотреит, 0,05 М АТР, по 2 нмоль олигомеров, 50 ед. активности Т4-ДНК-лигазы в течение 16 ч. Продукты сшивки выделяли 20% ПААГ в денатурирующих условиях и анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила от 5 до 17% за 25 мин.

Энзиматический гидролиз продуктов лигирования. 0,05 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида растворяли в 50 мкл буфера, содержащего 0,1 М трис-НСl (pH 8,9) и 0,015 М MgCl₂, и инкубировали с 4 ед. акт. SVPDE в течение 12 ч и затем с 1 ед. акт. ВАР в течение 1 ч при 37° С. Реакционную смесь анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 10% за 25 мин и далее от 10 до 20% за 10 мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шибанова Е. В., Филиппов С. А., Есинов Д. С., Коробко В. Г., Добрынин В. Н. // Бюорган. химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 99—106.
2. Ошевский С. И. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 310. № 1. С. 233—236.
3. Stec W. J., Zon G., Uznanski B. // J. Chromatogr. 1985. V. 326. № 1. P. 263—280.
4. Башук О. С., Заритова В. Ф., Левина А. С. // Бюорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 606—614.
5. Филиппов С. А., Есинов Д. С., Калинин С. В., Добрынин В. Н. // Бюорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 527—529.
6. Uznanski B., Niewiarowski W., Stec W. J. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 2. P. 592—598.
7. Oshevski S. I. // FEBS Lett. 1982. V. 143. № 1. P. 119—123.
8. Barone A. D., Tang J.-Y., Caruthers M. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.

Поступила в редакцию
28.1.1991

E. V. SHIBANOVA, D. S. ESIPOV, E. F. BOLDYREVA, V. G. KOROBKO,
V. N. DOBRYNIN

T4 DNA LIGATION OF 5'-PHOSPHOTHIOATE DNA FRAGMENTS

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow

T4 DNA ligation of oligonucleotide 5'-phosphothioate was found to result in the stereospecific formation of the phosphothioate internucleotide linkage with R_p-configuration.