



УДК 547.963.32.057:542.95

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ХИМИЧЕСКОГО ЛИГИРОВАНИЯ ДНК ПОД ДЕЙСТВИЕМ БРОМЦИАНА

© 1995 г. О. А. Федорова, М. Б. Готтих*, А. В. Максименко, Т. С. Орецкая, З. А. Шабарова

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
и химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва

Поступила в редакцию 08.02.95 г.

Изучен механизм химического лигирования ДНК под действием бромциана в присутствии N-замещенного морфолина. Показано, что первой стадией реакции является присоединение цианогруппы к третичному атому азота N-замещенного морфолина с образованием соответствующего четвертичного аммониевого катиона, который и осуществляет активацию фосфатной группы олигонуклеотида. Впервые показано, что этот метод активации можно использовать для получения фосфодиэфирных производных нуклеотидов вне ДНК-дуплекса. Подобраны оптимальные условия проведения химического лигирования.

Ключевые слова: химическое лигирование, бромциан, ДНК-дуплекс.

Метод химической сборки протяженных фрагментов ДНК (химическое лигирование) широко используется в настоящее время в химии нуклеиновых кислот. Он позволяет получать ДНК-последовательности с точечными модификациями по межнуклеотидным связям [1], разветвленные ДНК [2], циклические [3, 4] и химерные олигонуклеотиды, содержащие фрагменты разной нуклеотидной природы, например α - и β -нуклеотиды [5]. Получение этих соединений другими методами крайне затруднено или просто невозможно. Для синтеза фосфодиэфирной связи в методе ХЛ применяются два различных приема, предварительная активация фосфомоноэфирной группы, участвующей в образовании межнуклеотидной связи [6 - 8], или использование конденсирующего агента [9 - 11]. Чаще всего для этих целей употребляют водорастворимый 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид [9, 12] или бромциан [5, 6, 10, 11]. При этом описаны два варианта бромцианового метода ХЛ: в MES-буфере, содержащем триэтиламин [11], и в присутствии имидазола [10]. Показано, что при взаимодействии бромциана с имидазолом образуется цианимидазолонид, который и выступает в качестве конденсирующего агента [13]. Скорость ХЛ в этом случае сравнима со скоростью лигирования в присутствии карбодимида, и лигирование заканчивается

за 3 - 20 ч [10, 13]. Вариант ХЛ с использованием бромциана в MES-буфере уникален из-за скорости реакции - в стабильных линейных ДНК-дуплексах образование фосфодиэфирной межнуклеотидной связи заканчивается за 1 - 3 мин [11].

В нашей лаборатории была подробно изучена зависимость эффективности ХЛ под действием бромциана от природы реагирующих групп [1] и гетероциклических оснований нуклеотидов [14] в месте образования межнуклеотидной связи. Однако вопрос о механизме этой реакции оставался открытым.

Настоящая работа и посвящена изучению механизма ХЛ под действием бромциана и оптимизации условий этой реакции.

Влияние природы буфера на эффективность химического лигирования

Очевидно, что первым этапом ХЛ является активация фосфомоноэфирной группы в месте разрыва в ДНК-дуплексе. Поскольку механизм такой активации под действием бромциана в водной среде не был подробно изучен, нам представлялось важным выяснить, происходит ли активация фосфата непосредственно под действием бромциана или в этом процессе определенную роль играют компоненты буфера. Для этого мы проводили ХЛ в дуплексе (I), варьируя состав буфера. Оказалось, что успешное образование межнуклеотидной связи, приводящее к циклическому олигонуклеотиду, происходило только в MES- и N-метилморфолиновом буферах, т.е. в системах, содержащих N-замещенный морфолин (рис. 1).

Использованы сокращения: ХЛ - химическое лигирование, MES - морфолинэтансульфонат, HEPES - N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфонат, TEA - триэтиламин. Префикс "d" при обозначении олиго-2'-дезоксирибонуклеотидов опущен.

* Автор для переписки.

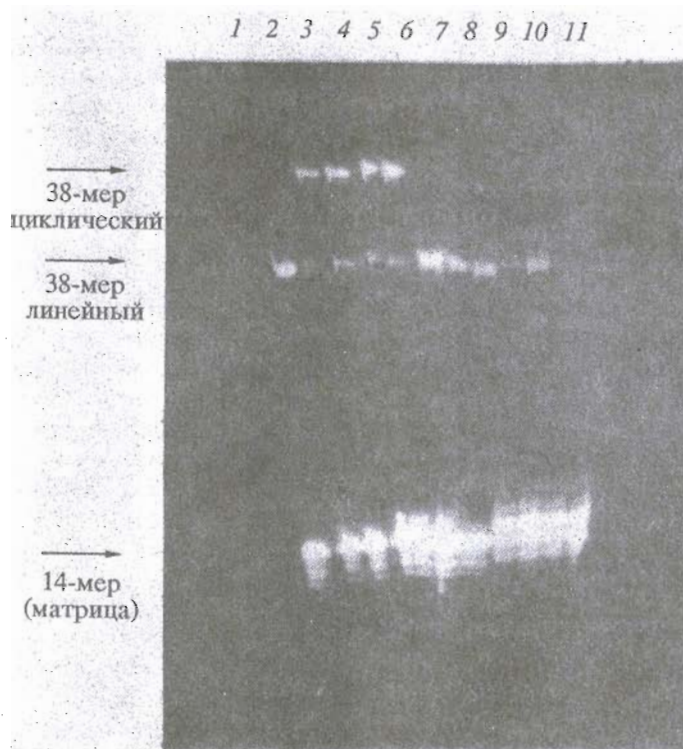
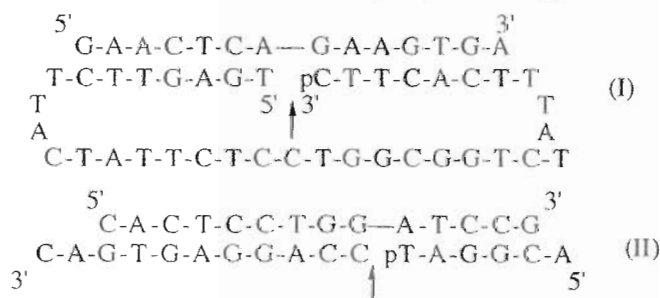


Рис. 1. Электрофоретический анализ (20% ПААГ) продуктов XII в дуплексе (I) при проведении реакции в буферах: 0.25 М MES (2), 0.25 М метилморфолин (4), 0.2 М натрий-фосфат, pH 7.5 (6), 0.016 М NaHCO₃ (8), 0.25 М HEPES (10) и в этих же буферах в присутствии 0.1 М TEA (соответственно дорожки 3, 5, 7, 9, 11).

При этом присутствие в этих буферах триэтиламина не играло никакой роли. На основании полученных результатов можно было предположить, что наличие N-замещенного морфолина необходимо для активации фосфатной группы.



Чтобы проверить, действительно ли активация фосфата происходит только при совместном действии бромциана и N-замещенного морфолина, мы исследовали процесс синтеза этилового эфира гуанозин-5'-фосфата в водной среде. Необходимо отметить, что до сих пор единственным реагентом, который позволял успешно синтезировать в водной среде эфиры моно- и олигонуклеотидов, был 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид [15]. Оказалось, что при обработке гуанозин-5'-фосфата бромцианом в 1 М N-метилморфолиновом или MES-буфере в присутствии 50% этанола удастся получить за 3 - 5 мин соответствующий этиловый эфир с выходом не

менее 70%. При этом важно подчеркнуть два момента. Во-первых, скорость образования этилового эфира мононуклеотида была сопоставима со скоростью синтеза межнуклеотидной связи, реакция заканчивалась за 3 - 5 мин. Во-вторых, реакция протекала только в присутствии N-метилморфолина; обработка мононуклеотида бромцианом в смеси вода-этанол (1 : 1) не привела к образованию эфира.

Все эти результаты однозначно показали: 1) для активации фосфомоноэфирной группы необходимо совместное присутствие бромциана и N-замещенного морфолина; 2) механизм этой активации в составе ДНК-дуплекса и вне его одинаков; 3) образующийся активированный фосфат крайне реакционноспособен и реагирует даже с такими слабыми нуклеофилами, как гидроксильная группа спирта или углеводного остатка олигонуклеотида, за 1 - 5 мин.

Влияние концентрации и pH буфера на эффективность химического лигирования

Одним из важных моментов настоящего исследования явилось изучение влияния концентрации N-замещенного морфолина на эффективность активации фосфатной группы. Для этого мы проводили синтез этилового эфира гуанозин-5'-фосфата при двух концентрациях MES-буфера: 0.25 и

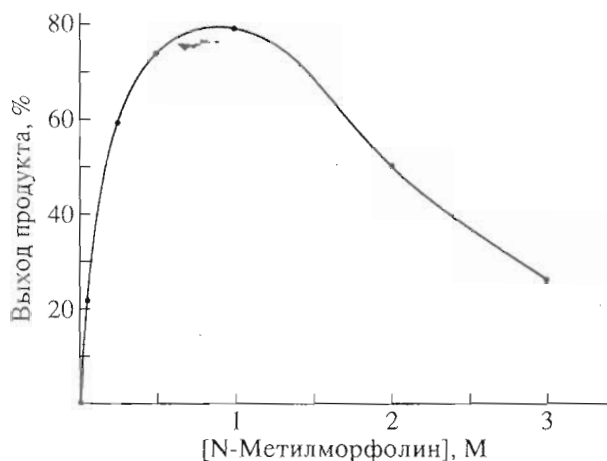


Рис. 2. Зависимость эффективности ХЛ в дуплексе (I) от концентрации N-метилморфолинового буфера (концентрация $MgCl_2$ 0.02 М, pH среды 7.5).

1 М. Оказалось, что в 0.25 М буфере выход эфира составил не более 50 - 55%, в то время как в 1 М он повышался до 70 - 80%.

Концентрация буфера оказывает существенное влияние и на эффективность синтеза межнуклеотидной связи. Из рис. 2 видно, что при повышении концентрации N-метилморфолина в реакционной смеси ХЛ в дуплексе (I) от 0.05 до 1 М выход циклического олигонуклеотида – продукта лигирования повышался, однако при дальнейшем увеличении концентрации амина его выход снижался. Аналогичная зависимость эффективности ХЛ от концентрации буфера наблюдалась нами и для MES-буфера в интервале концентрации 0.05 - 1 М; дальнейшее увеличение концентрации оказалось невозможным по причине ограниченной растворимости MES.

Таблица 1. Зависимость конечной величины pH среды ХЛ от концентрации N-метилморфолинового буфера (начальное значение pH 7.6, концентрация бромциана 0.5 М)

Концентрация буфера, М	0.05	0.25	0.5	1	2	3
Конечное значение pH	3.3	2.95	2.0	4.65	5.46	7.6

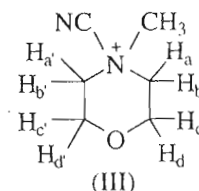
Таблица 2. Зависимость эффективности ХЛ в дуплексе (II) от pH N-метилморфолинового буфера

Концентрация буфера, М	pH		Эффективность лигирования, %
	начальный	конечный	
1	5.00	2.28	0
1	6.00	2.00	70 - 80
3	6.00	2.27	90 - 95
1	7.60	4.65	90 - 95
3	7.60	7.60	20 - 30

Чтобы объяснить эти результаты, мы проанализировали изменение pH N-метилморфолинового буфера после окончания ХЛ (начальное значение pH 7.6). Ранее было известно, что лигирование под действием бромциана сопровождается сильным закислением среды – как предполагалось, за счет выделения НВг при взаимодействии бромциана с фосфатом и водой [16]. Если бы N-метилморфолин выполнял в реакции только роль буфера, закисление среды плавно уменьшалось бы с увеличением концентрации N-метилморфолина. Из табл. 1 видно, что степень закисления меняется в зависимости от концентрации N-метилморфолина в смеси более сложным образом. Необходимо отметить, что нуклеотидная концентрация во всех случаях оставалась постоянной. Поэтому изменение pH среды можно было объяснить, только предположив, что бромциан взаимодействует с N-метилморфолином и выделение НВг происходит именно в результате этого процесса. Действительно, самое сильное снижение pH наблюдалось в случае 0.5 М буфера, что соответствует эквимолярному соотношению N-метилморфолина и бромциана в реакционной среде. В этом случае количество выделяемой кислоты максимально и, с другой стороны, в среде не остается свободного N-метилморфолина, который мог бы поддерживать pH. При увеличении концентрации N-метилморфолина свыше 0.5 М непрореагировавшая часть амина служит не реагентом, а буфером и закисление среды уменьшается.

Таким образом, увеличение выхода продуктов ХЛ при увеличении концентрации N-метилморфолинового буфера (рис. 2) объясняется увеличением содержания в среде активирующего фосфат агента, который являлся, по нашему мнению, продуктом взаимодействия бромциана и N-замещенного морфолина.

Важным результатом было и обнаруженное нами снижение эффективности ХЛ при увеличении концентрации N-метилморфолина до 2 - 3 М и соответствующем увеличении pH среды. Необходимо, однако, было выяснить, на какую стадию ХЛ негативно влияет увеличение значения pH: на взаимодействие бромциана с N-метилморфолином, на активацию фосфомоноэфирной группы или на взаимодействие активированного фосфата с нуклеофилом. Для этого мы изучили протекание ХЛ в дуплексе (II) в N-метилморфолиновом буфере с различными начальными pH.



Предварительно было установлено, что изменение значений pH от 5 до 8 не оказывает существенного влияния на термическую устойчивость

данного дуплекса. Из табл. 2 видно, что ХЛ эффективно происходит, если начальное значение рН среды не ниже 6 и вместе с тем если конечное значение рН не выше 5. Основываясь на полученных результатах, мы предположили, что бромциан может взаимодействовать только с протонированной формой N-метилморфолина. Чтобы понять природу образующегося при этом продукта, мы использовали метод ЯМР-спектроскопии.

Изучение механизма активации фосфатной группы методом ЯМР-спектроскопии

Использование метода ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C позволило нам установить, что при добавлении бромциана в N-метилморфолиновый буфер с рН 7.6 практически мгновенно образуется новое соединение, ^1H -ЯМР-спектр которого резко отличался от исходного спектра протонированного N-метилморфолина. Было установлено, что это соединение – продукт присоединения CN-группы к третичному атому азота в N-метилморфолине (катион (III)). Вместо двух широких четырехпротонных сигналов с δ 2.70 м. д. ($2\text{CH}_2\text{N}$) и 3.87 м. д. ($2\text{CH}_2\text{O}$), характерных для протонированного N-метилморфолина, появляются четыре двухпротонных сигнала со следующими химсдвигами: 4.00 (м, 2H), 3.68 (м, 2H ($\text{H}_c + \text{H}_e + \text{H}_d + \text{H}_f$)); 3.37 (м, 2H), 3.08 (м, 2H ($\text{H}_a + \text{H}_i + \text{H}_b + \text{H}_g$)). Сигнал CH_3N -группы смещается с 2.30 до 2.80 м. д. Кроме того, ^{13}C -ЯМР-спектр исходного N-метилморфолина содержит три сигнала: 45.32 (CH_3N), 54.69 ($2\text{CH}_2\text{N}$) и 66.63 м. д. ($2\text{CH}_2\text{O}$). После добавления бромциана положение этих сигналов в спектре почти не изменилось (44.32, 54.29 и 64.97 м. д.), однако добавился сигнал с δ 82.43 м. д., который может быть отнесен к цианогруппе.

Важно отметить, что полученная четвертичная аммониевая соль (соединение (III), схема) оказалась очень устойчивой в водной среде (мы регистрировали ее в течение по крайней мере 2 нед). Добавление к ней метилфосфата привело к мгновенному исчезновению сигналов соединения (III) и появлению сигналов протонированного N-метилморфолина. Кроме того, мы регистрировали исчезновение сигнала CN-группы в ^{13}C -спектре. Это связано с тем, что образующаяся в процессе реакции циановая кислота быстро гидролизуется до двуокиси углерода и аммиака (схема).

Таким образом, на основании данных ЯМР-спектроскопии можно заключить, что активация фосфатной группы происходит при ее взаимодействии с предварительно образующимся катионом (III), а не с самим бромцианом. При этом N-метилморфолин выполняет роль переносчика CN-группы. Мы предположили, что эту роль может выполнять и другой третичный амин, например N-метилими-

дазол. В этом случае и ХЛ, и синтез этилового эфира гуанозин-5'-фосфата должны протекать в N-метилимидазольном буфере так же эффективно и быстро, как и в N-метилморфолиновом. Чтобы проверить это предположение, мы провели синтез этилового эфира гуанозин-5'-фосфата в присутствии 50% этанола и различных аминов: N-метилморфолина, N-метилимидазола, триэтиламина и для сравнения – имидазола. Чтобы амин мог взаимодействовать с BrCN , он должен, очевидно, находиться в реакционной среде в протонированной форме. Поэтому для синтеза этилового эфира гуанозин-5'-фосфата использовались 1 М растворы вышеперечисленных аминов (кроме триэтиламина) с рН 7.6. Для триэтиламина рН реакционной смеси был равен 10. Оказалось, что во всех случаях синтез этилового эфира гуанозин-5'-фосфата происходил примерно с одинаковой эффективностью (50 - 70%). Однако при использовании имидазола скорость реакции была ниже (синтез заканчивался за несколько часов, в то время как в остальных случаях – за 5 - 10 мин), поскольку конденсирующим агентом в этом случае был менее реакционноспособный цианимидазол. Эти результаты хорошо согласуются с данными по скорости ХЛ под действием цианимидазолида [13].

Проведение ХЛ в присутствии триэтиламина с рН 10 не представлялось возможным, так как при этом значении рН ДНК-дуплекс диссоциирует. Что касается N-метилимидазольного буфера с рН 7.6, то мы установили, что он может использоваться для ХЛ, но эффективность синтеза межнуклеотидной связи в нем существенно ниже, чем в буферах, содержащих N-замещенный морфолин. Лигирование проводили в дуплексе, аналогичном

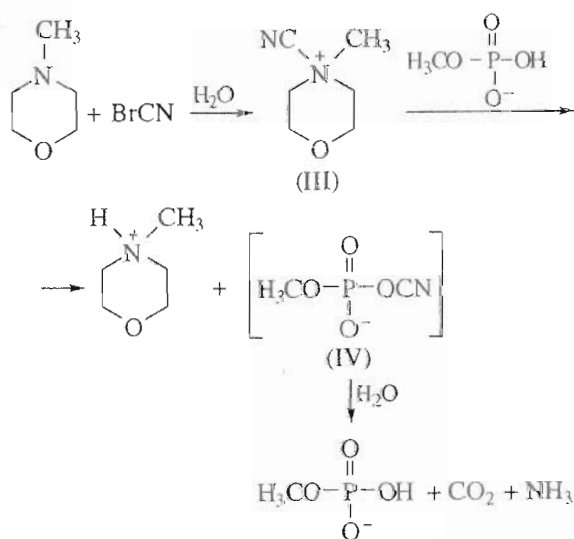


Схема активации фосфатной группы бромцианом в N-метилморфолиновом буфере.

дуплексу (I), но содержащем в месте образования фосфодиэфирной связи ^{32}P -меченый 5'-концевой фосфат и 3'-концевой гидроксил. Известно, что эффективность синтеза фосфодиэфирной связи в этом случае существенно ниже, чем при обратном расположении реагирующих групп [1], однако использование радиоактивного фосфата дает возможность количественно определить выходы продуктов лигирования. Эффективность ХЛ составила 33 - 35% для N-метилморфолинового, 40 - 42% для MES и 8 - 10% для N-метилимидазольного буфера.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что активация фосфомоноэфирной группы и последующий синтез фосфодиэфирной связи как в ДНК-дуплексах, так и вне их протекает по представленной схеме. Бромциан образует с третичными аминами четвертичный аммониевый катион (III), который очень устойчив в водной среде, но в то же время способен с высокой скоростью реагировать с таким сильным нуклеофилом, как монозамещенный фосфат. При этом образуется высокорекционноспособный смешанный ангидрид с циановой кислотой (соединение (IV), схема), быстро взаимодействующий с любыми, в том числе и со слабыми, нуклеофильными агентами, присутствующими в среде. Полученные результаты позволяют нам рекомендовать следующие оптимальные условия ХЛ с использованием бромциана: 1 М MES- или N-метилморфолиновый буфер, pH 7.6, содержащий 0.02 М MgCl_2 , 0.5 М бромциан; температура 0°C; время реакции 1 - 5 мин. В этих условиях выход циклического олигонуклеотида, образующегося в результате ХЛ в системе (I), составил 80%, что на 20% выше, чем в условиях, предложенных ранее [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5'-О-диметокситритил-3-(N,N-диизопропиламидо)- β -цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеотидов (Applied Biosystems, США), бромциан (5 М раствор в абс. ацетонитриле) (Aldrich, США).

Синтез олигонуклеотидов выполняли на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380 В (США). В качестве полимерного носителя использовали Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым нуклеотидным звеном 20 - 24 мкмоль/г.

Спектры ЯМР получены на спектрометре VXR-400. Для отнесения сигналов использованы методики АРТ [17], COSY [18] и HETCOR [19]. Для снятия спектров использовались раствор 0.5 М N-метилморфолина в D_2O , оттитрованный DCl до pH 7.5, и 0.5 М BrCN в CD_3CN .

Химическое лигирование проводили в буферах, состав которых указан в подписях к рис. 1, 2. В дуп-

лексе (I) 38-звенный линейный олигонуклеотид и 14-звенную матрицу смешивали в соотношении 1 : 2. В дуплексе (II) все три олигонуклеотида смешивали в эквимолярном соотношении. Смеси упаривали, растворяли в 100 мкл соответствующего буфера для получения концентрации ДНК-дуплекса 10^{-4} М в расчете на мономерное звено, нагревали до 90°C и медленно охлаждали до 0°C для формирования совершенного дуплекса. Затем добавляли 10 мкл 5 М раствора бромциана в ацетонитриле. Реакционную смесь инкубировали 1 - 5 мин при 0°C и осаждали олигонуклеотидный материал ацетоном из 2 М перхлората лития.

Продукты химического лигирования анализировали методом электрофореза в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. Положение олигонуклеотидов определяли после прокрашивания геля раствором бромистого этидия. Количественный анализ эффективности ХЛ осуществляли ион-парной хроматографией на приборе Waters (США) (градиент концентрации ацетонитрила 5 - 40% в 48 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7, содержащем 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламония; скорость элюции 1 мл/мин; 45°C).

Для синтеза этилового эфира гуанозин-5'-фосфата 1 мг Na-соли нуклеотида растворяли в 50 мкл соответствующего буфера, добавляли 50 мкл этанола и 10 мкл 5 М раствора бромциана в ацетонитриле. За ходом реакции следили с помощью ТСХ на пластинках Cellulose F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системе этанол-1 М ацетат аммония (7 : 3 по объему).

Работа выполнена при поддержке Международного научного фонда (ISF) (грант MXL000) и Российского правительства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shabarova Z.A. // *Biochimie*. 1988. V. 70. P. 1323 - 1334.
2. Dolinnaya N.G., Gryaznov S.M., Ahle D., Chang C.-A., Shabarova Z.A., Urlea M.S., Horn T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994. V. 4. P. 1011 - 1018.
3. Kool E.T. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1991. V. 113. P. 6265 - 6266.
4. Dolinnaya N.G., Blumenfeld M., Merenkova I.N., Oretskaya T.S., Krynetskaya N.F., Ivanovskaya M.G., Vasseur M., Shabarova Z.A. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5403 - 5407.
5. Gottikh M.B., Baud-Demattei M.-V., Lescot E., Giorgi-Renoli S., Shabarova Z.A., Dautry F., Malvy C., Bertrand J.-R. // *Gene*. 1994. V. 149. P. 5 - 12.
6. Inoue T., Orgel L.E. // *Science*. 1983. V. 219. P. 859 - 862.
7. Shabarova Z.A., Ivanovskaya M.G., Isagulians M.G. // *FEBS Lett.* 1983. V. 154. P. 288 - 291.
8. Готтих М.Б., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // *Биоорг. химия*. 1988. Т. 14. С. 500 - 510.

9. *Shabarova Z.A., Dolinnaya N.G., Drutsa V.L., Melnikova N.P., Purmal A.A.* // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. P. 5747 - 5761.
10. *Kanaya E., Yanagawa H.* // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 7423 - 7430.
11. *Соколова Н.И., Аширбекова Д.Е., Долинная Н.Г., Шабарова З.А.* // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. С. 1286 - 1288.
12. *Gao H., Yang M., Cook A.F.* // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 285 - 292.
13. *Luebke K.J., Dervan P.B.* // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 3005 - 3009.
14. *Меренкова И.Н., Долинная Н.Г., Орецкая Т.С., Соколова Н.И., Шабарова З.А.* // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 85 - 91.
15. *Ivanovskaya M.G., Gottikh M.B., Shabarova Z.A.* // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. P. 913 - 934.
16. *Долинная Н.Г.* Химические реакции в двуспиральных нуклеиновых кислотах, моделирующие действие ДНК-лигаз. Дис. ... д-ра хим. наук. МГУ, 1993. С. 12.
17. *Patt S.L., Shoolery J.N.* // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. P. 535 - 547.
18. *Vax A.* // J. Magn. Res. 1983. V. 53. P. 512 - 521.
19. *Muller L., Ernst R.R.* // Mol. Phys. 1978. V. 38. P. 963 - 992.

Study of Mechanism of Chemical Ligation of DNA with Cyanogen Bromide

O. A. Fedorova, M. B. Gottikh*, A. V. Maksimenko,
T. S. Oretskaya, and Z. A. Shabarova

*Belozerskii Scientific Research Institute of Physico-Chemical Biology and Faculty of Chemistry,
Moscow State University, Moscow, 119899 Russia*

Abstract – The mechanism of chemical ligation with cyanogen bromide in the presence of an N-substituted morpholine was studied. Addition of the cyano group to the tertiary nitrogen atom of the N-substituted morpholine with the formation of a quaternary ammonium cation is shown to be the first step of the reaction; it is this cation that activates the oligonucleotide phosphate group. This method of activation can be used to obtain phosphodiester derivatives of nucleotides without DNA duplex. Optimal conditions of the chemical ligation were selected.

Key words: chemical ligation, cyanogen bromide, DNA duplex.

* To whom correspondence should be addressed.