



УДК 547.963.32.057.542.95:577.113

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОВАЛЕНТНО ЗАМКНУТЫХ ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПИРОФОСФАТНУЮ И ЗАМЕЩЕННУЮ ПИРОФОСФАТНУЮ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫЕ ГРУППИРОВКИ

© 1996 г. С. А. Кузнецова[#], И. Э. Каневский, Т. С. Орецкая, З. А. Шабарова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва, В-234, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 27.12.95 г.

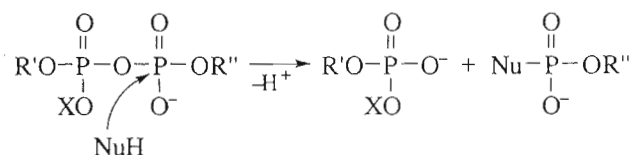
Предложен новый подход, позволяющий с высокой эффективностью получать ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы (ДНК-дамблы) и вводить в их структуру пирофосфатную и замещенную пирофосфатную межнуклеотидные группировки. Он включает химическое лигирование в ДНК-дуплексах, образованных полинуклеотидом, концы которого сближены за счет введения мини-шпилечной

структуры $\begin{matrix} 5' \text{ GTA} \\ 3' \text{ САА} \end{matrix}$. ДНК-дамблы, содержащие пирофосфатную (замещенную пирофосфатную) группировку, образуются в результате взаимодействия 3'-концевой фосфатной (метилфосфатной) группы полинуклеотида с 5'-концевой фосфатной группой гуанозина мини-шпилечной последовательности, фланкирующей его с 5'-конца. В качестве конденсирующего агента использовали EDC. Выходы 42-звенных ковалентно замкнутых ДНК-дуплексов, содержащих пирофосфатную группировку, достигали 98%, а замещенную пирофосфатную группировку – 25%. Изучена реакционная способность замещенной пирофосфатной группировки в составе ДНК-дамблов. Показано, что она химически активна и эффективно взаимодействует с нуклеофилами в водной среде при pH 8.0.

Ключевые слова: ковалентно замкнутый ДНК-дуплекс, пирофосфатная и замещенная пирофосфатная межнуклеотидные группировки, мини-шпилечная структура, химическое лигирование.

Синтетические аналоги субстратов ДНК-узнающих белков, содержащие различные модификации сахарофосфатного остова, широко используются для изучения топографии активного центра этих белков и молекулярного механизма НК-белкового узнавания [1–4]. Недавно нами в качестве аналогов субстратов были предложены синтетические ДНК-дуплексы, содержащие в участке узнавания в одной из цепей замещенную пирофосфатную группировку вместо природной фосфодиэфирной [5, 6]. Было показано, что ангидридная связь в соединениях такой структуры активна и эффективно расщепляется при взаимодействии с нуклеофилами, в том числе и с нуклеофильными группами основных аминокислот [5, 7]. Реакция протекает в соответствии с механизмом нуклеофильного замещения у атома фосфора. При этом атака нуклеофила идет по дизамещенной фосфатной группе трехзамещенной пирофосфатной груп-

пировки и завершается ее расщеплением с переносом остатка олигонуклеотида на нуклеофил:



где R'O, OR'' – остатки олигонуклеотидов, X – заместитель ненуклеотидной природы, NuH – нуклеофильный агент.

На основе ДНК-дуплексов, содержащих замещенную пирофосфатную группировку в участке узнавания ряда ДНК-узнающих белков, были сконструированы аффинные реагенты для зондирования активных центров этих белков. К настоящему времени с помощью таких соединений с высокой эффективностью было проведено аффинное мечение ферментов рестрикции-модификации EcoRI, RsrI [8], эндонуклеазы рестрикции EcoRII [7] и транскрипционного фактора HNF1 [9]. На примере HNF1 было показано, что ДНК-субстрат с замещенной пирофосфатной группировкой направленно модифицирует не только активный центр чистого белка, полученного генно-инженерным путем, но и HNF1 из экстракта клеток

Сокращения: EDC – 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид, MES – 2-морфолиноэтансульфонат, Melm – N-метилимидазол, EDA – этилендиамин, НК – нуклеиновая кислота.

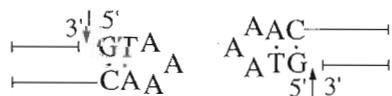
[#] Автор для переписки (тел.: 939-31-53, факс: 939-31-81).

печени крысы. В связи с этим мы полагаем, что такие соединения могут быть использованы в качестве ингибиторов ряда ферментов и регуляторных белков в молекулярно-биологических исследованиях, а также в качестве потенциальных терапевтических препаратов для лечения широкого спектра заболеваний, включая раковые заболевания и СПИД. Однако существенным ограничением при использовании синтетических ДНК-дуплексов для этих целей является их чувствительность к действию клеточных ферментов.

Для стабилизации фрагментов НК в клетке в настоящее время используют несколько подходов. Они включают модификацию их фосфатных [10, 11] и 2'-гидроксильных групп [12, 13], формирование шпилечных структур [14, 15], введение на концы олигонуклеотидов коротких мини-шпилек, обладающих аномально высокой термостабильностью и устойчивостью к экзонуклеазам [16, 17], а также конструирование ДНК-дамблов* [15] и циклических ДНК [18]. Подход, включающий химическую модификацию отдельных функциональных групп ДНК, достаточно трудоемок и требует проведения сложного химического синтеза и последующей очистки. Второй подход, предполагающий использование шпилечных структур ДНК, представляет большой интерес, поскольку такие соединения могут быть получены в процессе стандартного синтеза на автомате-синтезаторе. Однако было установлено, что ДНК-дамблы имеют значительно большую устойчивость к нуклеазной деградации, чем аналогичные шпилечные структуры [15], и поэтому эти соединения, на наш взгляд, наиболее привлекательны.

В настоящей работе предложен оригинальный подход, позволяющий с высокой эффективностью получать ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы и вводить в их структуру пиродифосфатную и реакционноспособную замещенную пиродифосфатную межнуклеотидные группировки. Этот подход базируется на обнаруженном нами ранее [19] свойстве гептануклеотидной последовательности (5')GТАААС образовывать мини-шпилечную

структуру $\begin{matrix} 5' \text{GTA} \\ 3' \text{CAA} \end{matrix}$ А, стабилизированную всего двумя парами оснований. Фланкирование ДНК-дуплексов такой гептануклеотидной последовательностью приводит к образованию в растворе следующих структур:



* ДНК-дамбл (dumbbell) – ДНК, имеющая форму гантели (распространенное и установившееся в англоязычной литературе обозначение ковалентно замкнутых ДНК-дуплексов, фланкированных с обоих концов одноцепочечными последовательностями).

(прямой линией обозначены комплементарные последовательности олигонуклеотидов, стрелкой – положение “ника”).

Особенностью такого рода структур является то, что в результате вовлечения в комплементарные взаимодействия 3'-концевой нуклеотид одной из цепей ДНК-дуплекса оказывается сближенным с 5'-концевым нуклеотидом другой цепи и между ними становится возможной химическая реакция, приводящая к образованию ковалентной связи. Эта реакция аналогична химическому лигированию, протекающему между олигонуклеотидами, сближенными на комплементарной матрице [20]. В данном случае в роли одного из олигонуклеотидов выступает 5'-концевой динуклеотидный фрагмент GT олигонуклеотида-матрицы, а ковалентная связь образуется между цепями ДНК-дуплекса. Проведение химического лигирования в ДНК-дуплексах, фланкированных (5')GТАААС-последовательностью, позволит получать циклические ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы (дамблы), а также вводить в их структуру реакционноспособную замещенную пиродифосфатную группировку.

Для реализации предложенного подхода в качестве исходных были выбраны 14- и 21-звенные олигонуклеотиды, входящие в состав ДНК-дуплекса (I), а также 42-звенные олигонуклеотиды, формирующие в водном буферном растворе ДНК-дуплексы (II) и (III) (рис. 1). Олигонуклеотиды, входящие в состав ДНК-дуплексов (I)–(III), были синтезированы стандартным амидофосфитным методом на автомате-синтезаторе Applied Biosystems Model 380B [21]. ДНК-дуплексы (I)–(III) содержали остаток 2'-дезоксигуанидина (U) и являлись аналогами субстратов урацил-ДНК-гликозилазы (КФ 3.2.2.3). В дуплексе (II) реакционноспособную замещенную, а также стабильную незамещенную пиродифосфатные группировки вводили между нуклеотидами T и G верхней цепи, содержащей остаток U, на расстоянии пяти нуклеотидов от него. В дуплексе (III) замещенную и незамещенную пиродифосфатные группировки вводили в противоположную цепь между нуклеотидами G и C.

Полученные модифицированные ДНК-дуплексы (IIa) и (IIIa) планировалось использовать для изучения возможности расплетания двойной спирали ДНК в процессе функционирования урацил-ДНК-гликозилазы, а ДНК-дуплексы (IIб) и (IIIб) – для аффинной модификации этого фермента. ДНК-дуплекс (I) использовали в качестве модельного для изучения химического лигирования, протекающего в “нике”, примыкающем к мини-шпи-

лечной структуре $\begin{matrix} 5' \text{GTA} \\ 3' \text{CAA} \end{matrix}$ А. Поскольку химическое лигирование протекает только между сближенными в пространстве реакционноспособными группами, его осуществление в ДНК-дуплексе (I) будет

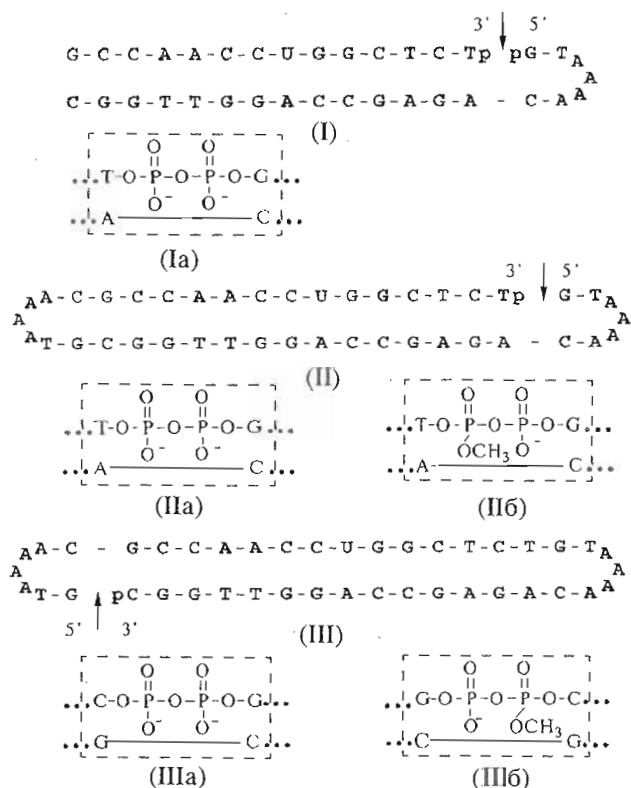


Рис. 1. Структура олигонуклеотидов и сформированных ими ДНК-дуплексов, используемых в работе. Стрелкой обозначено место введения пирофосфатной (замещенной пирофосфатной) группировки. В рамке схематически показан участок дуплекса после образования ковалентной связи.

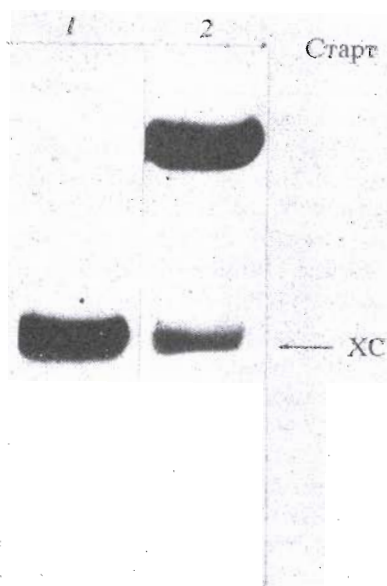


Рис. 2. Электрофорез в 20% ПААГ реакционной смеси, образующейся в результате химического лигирования в ДНК-дуплексе (I): 1 - [³²P]pGТААААСАГА-ГССАГГТТГГС; 2 - реакционная смесь. ХС - положение красителя-маркера ксиленицианола.

свидетельствовать в пользу того, что 3'-концевой тимидин верхней цепи и 5'-концевой гуанозин нижней сближены, т.е. о существовании мини-шпилечной структуры.

Химическое лигирование в ДНК-дуплексе (I) проводили, используя в качестве конденсирующего агента EDC (см. "Экспер. часть"). Контроль за ходом реакции осуществляли электрофорезом в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях, используя ³²P-меченый 21-звенный олигонуклеотид. Как видно из анализа реакционной смеси (рис. 2), в результате химического лигирования с высокой эффективностью образуется продукт с меньшей электрофоретической подвижностью (дуплекс Ia). Выход полученного соединения составил 95% (см. таблицы). Результаты анализа его первичной структуры, проведенного по методу Максама-Гилберта [22] (рис. 3), подтверждают наличие последовательности

5'GCCAACC(U)GGCTCTppGТААААСАГАГССАГГТТГГС 3', образование которой возможно только при участии

мини-шпилечной структуры $\begin{matrix} 5' \text{ GTA} \\ 3' \text{ CAA} \end{matrix}$ А.

Поскольку реакция химического лигирования протекала между сближенными 3'-концевой фосфатной группой 14-звенного и 5'-концевой фосфатной группой 5'-³²P-меченого 21-звенного олигонуклеотидов, образующих ДНК-дуплекс (I), результатом ее было введение в структуру дуплекса незамещенной пирофосфатной межнуклеотидной группировки. Следует обратить внимание на то, что при секвенировании соединения (Ia) (рис. 3) в дорожках, соответствующих расщеплению по Т и С, полосы слабые или отсутствуют вовсе. Снижение эффективности реакций по Т и С (обработка растворами КМnO₄ и NH₂OH соответственно) свидетельствует о стабильности этого ДНК-дуплекса в процессе секвенирования.

Термическую устойчивость ДНК-дуплексов (I) и (Ia) изучали в буфере Г. Как видно из рис. 4, форма кривых плавления ДНК-дуплексов (I) и (Ia) и его высокая кооперативность свидетельствуют об образовании стабильных комплементарных комплексов. Температура плавления ($T_{пл}$) ДНК-дуплекса (Ia) составила 70°C, что на 35°C выше, чем у ДНК-дуплекса (I) (см. также таблицу).

Таким образом, полученные экспериментальные данные однозначно подтверждают существование

мини-шпилечной структуры $\begin{matrix} 5' \text{ GTA} \\ 3' \text{ CAA} \end{matrix}$ А, ста-

билизированной всего двумя парами оснований. Подобные мини-шпилечные структуры известны из литературы [16], однако все они содержали в двухцепочечной части только G · C-пары. Предложенная же в настоящей работе гептануклеотидная последовательность (5')GТААААС стабилизирована одной G · C- и одной А · Т-парами.

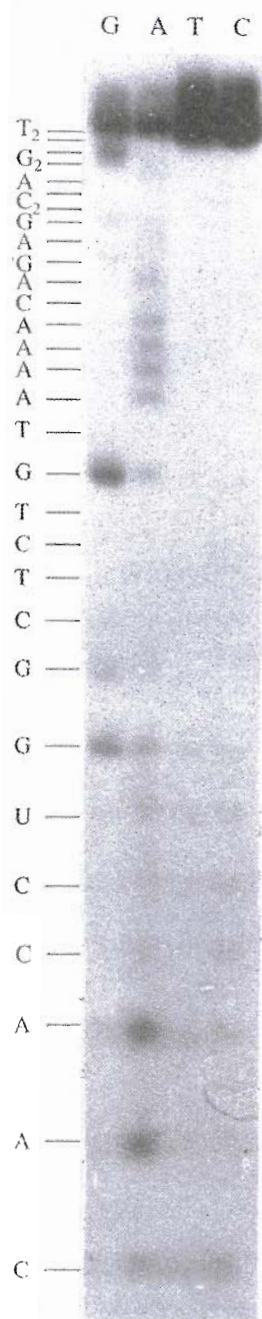


Рис. 3. Анализ методом Максама-Гилберта нуклеотидной последовательности дуплекса (Ia). Электрофорез в 20% ПААГ.

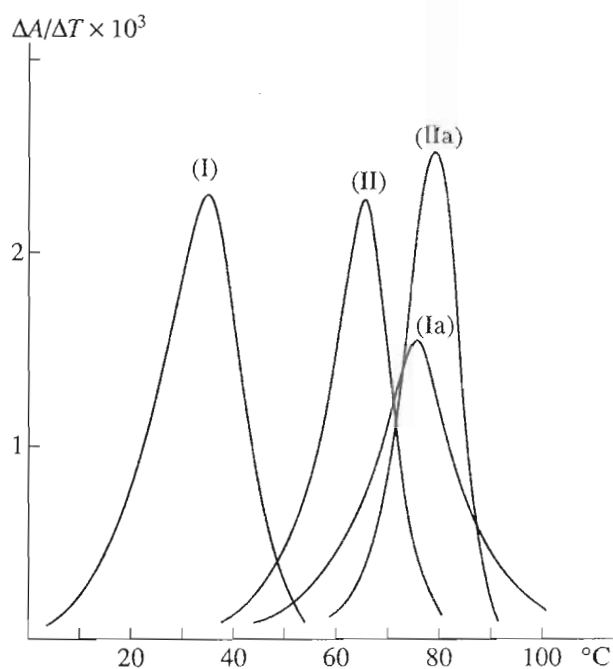


Рис. 4. Кривые плавления ДНК-дуплексов (I), (Ia), (II) и (IIa) в дифференциальной форме. Условия см. в "Экспер. части".

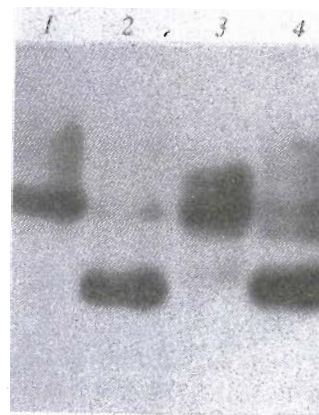


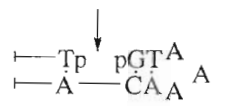
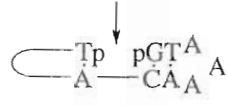
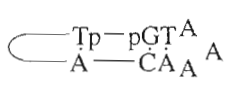
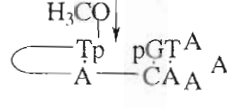
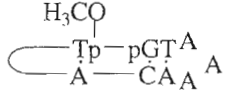
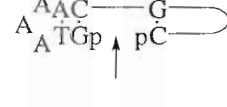
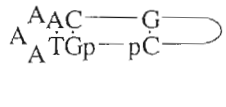
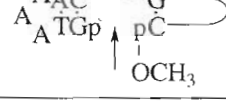
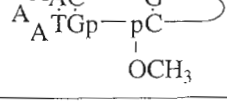
Рис. 5. Электрофорез в 12% ПААГ ³²P-меченых олигонуклеотидов (III) (I) и (II) (3), а также реакционных смесей, образующихся в результате их химического лигирования с получением циклических дуплексов (IIa) и (IIb) (дорожки 2 и 4 соответственно). Условия реакции см. в "Экспер. части".

Исключительно высокая эффективность химического лигирования в ДНК-дуплексе (I), сформированном с участием этой мини-шпильчатой структуры, позволила нам использовать ее для синтеза модифицированных ДНК-дамблов (IIa), (IIб), (IIIa) и (IIIб).

Синтез ковалентно замкнутых ДНК-дуплексов (IIa) и (IIIa), содержащих пирофосфатную межнуклеотидную группировку, проводили пу-

тем конденсации под действием EDC 3'- и 5'-концевых фосфатных групп 5'-фосфорилированных 42-звенных олигонуклеотидов, формирующих ДНК-дуплексы (II) и (III). 5'-Фосфорилирование осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Химическое лигирование в ДНК-дуплексах (II) и (III) проводили в условиях, аналогичных лигированию для ДНК-дуплекса (I). Как видно из радиоавтографа реакционных смесей синтеза ДНК-дамблов (IIa) и (IIIa) (рис. 5), в результате

Выходы продуктов химического лигирования в ДНК-дуплексах (I)–(III)*

| Структура исходных дуплексов | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ | Выходы продуктов реакции, % | Структура продуктов лигирования | Обозначение продуктов | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ |
|---|--------------------------|-----------------------------|--|-----------------------|--------------------------|
|  | 35 | 95 |  | (Ia) | 70 |
|  | 66 | 95 |  | (IIa) | 81 |
|  | – | 12 |  | (IIIб) | – |
|  | – | 98 |  | (IIIa) | – |
|  | – | 25 |  | (IIIб) | – |

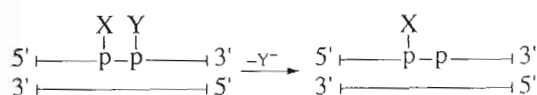
* Структуры ДНК-дуплексов изображены схематически. Полные формулы показаны на рис. 1. Стрелкой обозначено место, в котором происходит химическое лигирование.

химического лигирования в обоих случаях образуются продукты, обладающие более высокой электрофоретической подвижностью по сравнению с исходными соединениями. Выход продуктов был близок к количественному и составлял 95 и 98% соответственно. Сходное изменение электрофоретической подвижности отмечено при синтезе ДНК-дамблов с природной фосфодиэфирной связью с другой последовательностью оснований и длиной цепи [23]. Полученные в результате химического лигирования ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы (IIa) и (IIIa) оказались, как и ожидалось, устойчивы к действию фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы, что подтверждает их циклическую структуру.

Термическую устойчивость полученных ДНК-дамблов изучали на примере соединения (IIIa). Из рис. 4 и таблицы видно, что образование ковалентно замкнутой циклической структуры способствует стабилизации дуплекса (IIa) по сравнению с исходным дуплексом (II) ($\Delta T_{пл} 15^\circ\text{C}$).

Для синтеза ДНК-дамблов (IIб) и (IIIб), содержащих замещенную пирофосфатную группировку, мы также использовали химическое лигирование под действием EDC. Ранее [5] мы показали, что этот метод оптимален для введения замещенной пирофосфатной группировки в линейные ДНК-дуплексы. Он включает конденсацию на компле-

ментарной матрице двух олигонуклеотидов, один из которых содержит на 3'-концевой фосфатной группе остатки алифатических спиртов или аминов, а другой – активированную 5'-концевую фосфатную группу:



(прямыми линиями обозначены олигонуклеотиды, X – остаток алифатического спирта или амина, Y – остаток EDC).

Эффективность этой реакции составляла от 35 до 80% в зависимости от длины и структуры ДНК-дуплекса, а также от природы нуклеотидного заместителя [5]. В качестве нуклеотидного заместителя в данной работе использовали остаток метанола. Ранее мы установили, что скорость расщепления замещенной пирофосфатной группировки под действием нуклеофилов выше в том случае, когда нуклеотидный заместитель – остаток алифатического спирта [24]. Следовательно, эффективность кросслинкинга с белками в этом случае также должна быть выше. Остаток метанола был выбран также и потому, что он вносит минимальные искажения в структуру ДНК-дуплекса по сравнению с другими алкокси-группами.

Метилирование 3'-концевой фосфатной группы олигонуклеотидов, формирующих ДНК-дуплексы (II) и (III), проводили в присутствии избытка метанола под действием EDC. Эта реакция протекает с количественным выходом за 12 ч.

ДНК-дамблы (IIб) и (IIIб) получали конденсацией сближенных в результате комплементарных взаимодействий 5'-концевой фосфатной и 3'-концевой метилфосфатной групп олигонуклеотидов, входящих в состав ДНК-дуплексов (II) и (III). 5'-Концевую фосфатную группу вводили в олигонуклеотиды, используя T4-полинуклеотидкиназу и АТР. Реакцию химического лигирования проводили в буфере А при 4°C в течение 48 ч. В обоих случаях также наблюдалось (рис. 6) образование продуктов с большей электрофоретической подвижностью, чем исходные соединения, однако их выходы были ниже, чем в случае соединений (IIа) и (IIIа), содержащих пирофосфатную группировку, и составили 12 и 25% соответственно (см. таблицу). Это связано с различием в нуклеофильности моно- и дизамещенных фосфатных групп, участвующих в реакции. Следует отметить, что аналогичные выходы наблюдали при введении замещенной пирофосфатной группировки в структуру линейных ДНК-дуплексов в том случае, когда ненуклеотидный заместитель был остатком алифатического спирта [5, 24]. Полученные в результате химического лигирования ДНК-дамблы (IIб) и (IIIб), как и (IIа) и (IIIа), оказались устойчивыми к действию фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы, что подтверждает их циклическую структуру.

Исследование реакционной способности замещенной пирофосфатной группировки в составе ковалентно замкнутых ДНК-дуплексов вызвало особый интерес, поскольку устойчивость этой группировки в соединениях различной природы неодинакова. Так, замещенная пирофосфатная группировка в составе одноцепочечных олигонуклеотидов оказалась достаточно стабильной в водных буферных растворах при pH 6.0–8.5 и в то же время легко и количественно расщеплялась под действием, например, 0.5 М водного раствора этилендиамина (EDA), pH 8.0, или 0.4 М раствора N-метилимидазола (MeIm), pH 8.0, при 37°C за несколько часов [23]. Линейные 13–14-звенные ДНК-дуплексы с замещенной пирофосфатной группировкой оказались стабильнее, чем одноцепочечные олигонуклеотиды [7].

Реакционную способность ДНК-дамблов (IIб) и (IIIб), содержащих замещенную пирофосфатную группировку, изучали, используя в качестве нуклеофильных реагентов также EDA и MeIm. Аминолиз проводили в течение 16 ч при 37°C. На рис. 7 в качестве примера приведен радиоавтограф реакционных смесей, образующихся в ре-

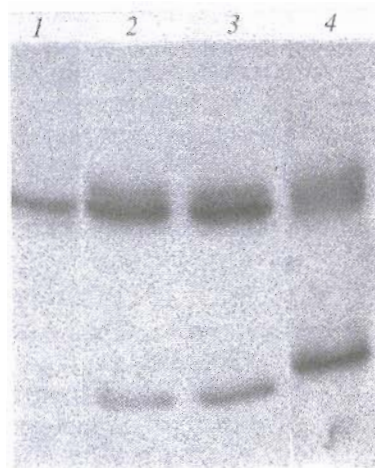


Рис. 6. Электрофорез в 12% ПААГ 5'-³²P-меченого олигонуклеотида (II) (1) и реакционной смеси, образующейся в результате его химического лигирования (синтез соединения (IIб)) за 24 и 48 ч (2 и 3 соответственно), а также реакционной смеси, образующейся при синтезе соединения (IIIб) за 48 ч (4). Условия см. в "Экспер. части".

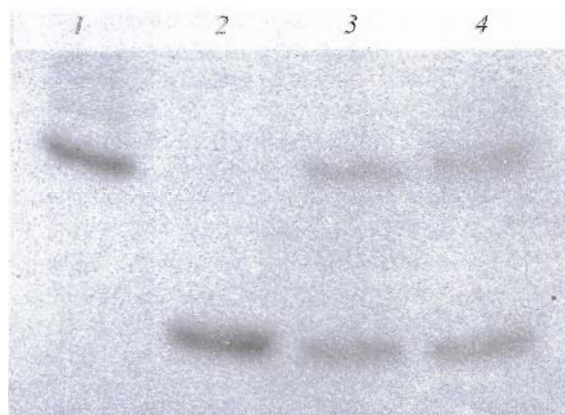
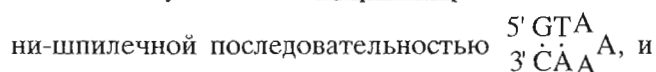


Рис. 7. Электрофорез в 12% ПААГ 5'-³²P-меченого 3'-метилового эфира олигонуклеотида (II) (1), ДНК-дуплекса (IIб) (2) и реакционных смесей, образующихся в результате его аминолита MeIm (3) и EDA (4). Условия аминолита см. в "Экспер. части".

зультате аминолита соединения (IIб). Как видно из рисунка, замещенная пирофосфатная группировка расщепляется в этих условиях на ~50% под действием как EDA, так и MeIm. Аналогичные результаты были получены для соединения (IIIб). Все эти данные свидетельствуют о том, что замещенная пирофосфатная группировка в составе ковалентно замкнутых ДНК-дуплексов химически активна и взаимодействует с нуклеофилами в водной среде при pH 8.0. Вместе с тем ДНК-дамблы более устойчивы к действию нуклеофилов, чем линейные ДНК-дуплексы или одноцепочечные олигонуклеотиды, содержащие замещенную пирофосфатную группировку [5, 7].

Таким образом, в настоящей работе предложен подход, позволяющий с высокой эффективностью синтезировать ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы, а также вводить в их структуру реакционноспособную замещенную пирофосфатную группировку. Этот подход включает химическое лигирование в ДНК-дуплексах, сформированных олигонуклеотидами, фланкированными мини-шпилечной последовательностью



может быть рекомендован как общий метод получения ДНК-дамблов, поскольку такие ДНК-дуплексы могут быть сформированы олигонуклеотидами любой длины и состава, а мини-шпилечная последовательность вводится в их структуру в процессе автоматического синтеза.

ДНК-дамблы, содержащие замещенную пирофосфатную группировку, устойчивы к действию клеточных экзонуклеаз и в то же время обладают способностью достаточно эффективно взаимодействовать с нуклеофилами в водной среде. Поэтому ДНК-дамблы с указанной модификацией в участке узнавания ДНК-связывающих белков являются перспективными реагентами для зондирования активных центров белков и обнаружения нуклеофильных аминокислот, находящихся в непосредственном контакте с сахарофосфатным остовом ДНК, а также могут использоваться в качестве потенциальных ингибиторов ряда белковых факторов. Наряду с этим мы полагаем, что ДНК-дамблы с незамещенными пирофосфатными группировками могут использоваться для зондирования электростатических ДНК-белковых взаимодействий и выявления в активном центре белка областей, богатых нуклеофильными аминокислотами. Это предположение базируется на том, что данная модификация сахарофосфатного остова ДНК приводит к появлению дополнительного отрицательного заряда, что в свою очередь должно усиливать связывание таких аналогов субстратов с положительно заряженными нуклеофильными аминокислотами.

Полученные в настоящей работе ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы используются для изучения механизма действия урацил-ДНК-гликозилазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали EDC, MeIm (Merck, Германия); MES, EDA, акриламид, N,N'-метиленисакриламид (Serva, Германия); фосфодиэстеразу змеиного яда (Worthington Biochem. Corp., США); фосфомоноэстеразу (Sigma, США); полинуклеотидкиназу T4 (КФ 2.7.1.78, "Сибэнзим", Россия); [γ - ^{32}P]ATP (1000 Ки/ммоль; "Изотоп", Россия).

Буферы: А – 0.05 М MES (pH 6.0), 0.02 М MgCl_2 ; В – 0.25 М MES (pH 4.5), 0.5 М MgCl_2 ; В – 0.2 М трис-HCl (pH 8.5), 0.04 М MgCl_2 ; Г – 0.02 М трис-HCl (pH 7.5), 0.06 М NaCl, 0.01 М EDTA.

Олигонуклеотиды, использованные в настоящей работе, были синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе Applied Biosystems 380В по стандартной амидофосфитной схеме. 3'-Концевую фосфатную группу вводили в процессе синтеза, используя полимерный носитель, содержащий β -сульфоэтильную якорную группу [25].

5'- ^{32}P -Фосфорилирование олигонуклеотидов, несущих 3'-концевую фосфатную или метилфосфатную группу, проводили по стандартной методике, используя T4-полинуклеотидкиназу и [γ - ^{32}P]ATP [26]. Структура олигонуклеотидов представлена на рис. 1.

3'-О-метилловые эфиры олигонуклеотидов. 3'-Фосфорилированные олигонуклеотиды (0.001–0.02 мкмоль) инкубировали 12 ч при 4°C в 110 мкл буфера В, содержащего 35% CH_3OH и 11 мг (57.4 мкмоль) EDC. Затем олигонуклеотидный материал осаждали из реакционной смеси 10 объемами 2% LiClO_4 в ацетоне, трижды повторяя эту процедуру.

ДНК-дуплекс (Ia), содержащий пирофосфатную межнуклеотидную группировку. ДНК-дуплекс (I) (концентрация в расчете на мономерное звено $C_0 = 10^{-3}$ М) инкубировали в присутствии 0.2 М EDC в буфере А. Реакцию проводили 16 ч при 4°C. Олигонуклеотидный материал осаждали 10 объемами 2% LiClO_4 в ацетоне, реакционную смесь анализировали электрофорезом в 12% ПААГ. Продукты реакции элюировали из геля 2 М водным раствором LiClO_4 и осаждали 5 объемами ацетона.

Ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы (IIa) и (IIIa), содержащие пирофосфатную межнуклеотидную группировку. 3',5'-Дифосфорилированные 42-звенные олигонуклеотиды, формирующие ДНК-дуплексы (II) и (III) (концентрация в расчете на мономерное звено $C_0 = 10^{-3}$ М), инкубировали в буфере А 3 мин при 95°C и медленно охлаждали в течение нескольких часов. Затем добавляли EDC до концентрации 0.2 М и инкубировали как описано для соединения (Ia). Олигонуклеотидный материал осаждали и анализировали аналогичным образом.

Ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы (IIб) и (IIIб), содержащие замещенную пирофосфатную межнуклеотидную группировку. 5'-Фосфорилированные 3'-О-метилловые эфиры олигонуклеотидов, формирующие ДНК-дуплексы (II) и (III), после предварительного отжига инкубировали в присутствии 0.2 М EDC как описано для соединения (Ia) в течение 24 и 48 ч. Олигонуклеотидный

материал осаждали и анализировали аналогичным образом.

Обработка смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы. По 0.1–0.5 нмоль соединений (IIa), (IIб), (IIIa) и (IIIб), растворенных в 10–30 мкл буфера В, обрабатывали смесью щелочной фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда 3 ч при 37°C. Олигонуклеотидный материал осаждали раствором 2% LiClO₄ в ацетоне и анализировали в 12% ПААГ.

Аминолиз ковалентно замкнутых ДНК-дуплексов (IIб) и (IIIб) EDA и MeIm. Соединения (IIб) и (IIIб) (0.1–0.5 нмоль) обрабатывали 16 ч при 37°C 0.5 М водным раствором EDA, pH 8.0, или 0.4 М водным раствором MeIm, pH 8.0. Олигонуклеотидный материал осаждали 2% LiClO₄ в ацетоне, дважды переосаждали и анализировали в 12% ПААГ.

Температурную зависимость УФ-поглощения комплексов измеряли в буфере Г при C₀ = 2 × 10⁻⁵ М на двухлучевом спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5°C/мин в термостатируемых кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм. Результаты плавления представлены в виде

$$f(T) = \Delta A_{260} / \Delta T,$$

где ΔA₂₆₀ – изменение поглощения раствора при изменении температуры на величину ΔT.

Работа была выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 94-04-12649-а), а также Государственной научно-исследовательской программы “Новейшие методы биоинженерии” (08.05), направление: “Тен-направленные биологически активные вещества”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guga P., Koziolkiewicz M., Okruszek A., Uznanski B., Stec W.J. // Nucleosides Nucleotides. 1987. V. 6. P. 111–119.
2. Olsen D.B., Kotzorek G., Sayers J.R., Eckstein F.J. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 14389–14394.
3. Koziolkiewicz M., Stec W.J. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9460–9466.
4. Mayer A.N., Varany F.J. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 29067–29076.
5. Кузнецова С.А., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 219–225.
6. Kuznetsova S.A., Ivanovskaya M.G., Shabarova Z.A. // Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 235.

7. Шабарова З.А., Шефлян Г.Я., Кузнецова С.А., Кубарева Е.А., Сысоев О.Н., Ивановская М.Г., Громова Е.С. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 413–419.
8. Purmal A.A., Shabarova Z.A., Gumpert R.I. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 3713–3719.
9. Blumenfeld M., Kuznetsova S., Clusel C., Ugarto E., Shabarova Z., Vasseur M. // J. Cell. Biochem. 1994. V. 186. P. 42.
10. Tam R.C., Li Y., Noonberg S., Hwang D.G., Lui G., Hunt C.A., Garovoy M.R. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 977–986.
11. Fathi R., Huang Q., Coppola G., Delaney W., Teasdale R., Krieg A.M., Cook A.F. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 5416–5424.
12. Sproat B.S., Lamond A.I., Beijer B., Neuner P., Ryder U. // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 3373–3386.
13. Iribarren A.M., Sproat B.S., Neuner P., Sulston I., Ryder U., Lamond A.I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 7747–7751.
14. Chu B.C.F., Orgel L.E. // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 6958.
15. Chu B.C.F., Orgel L.E. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 5857–5858.
16. Hirao I., Kawai G., Yoshizawa S., Nishimura Y., Ishido Y., Watanabe K., Miura K. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 576–582.
17. Khan I.M., Coulson J.M. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 2957–2958.
18. Dolinnaya N.G., Blumenfeld M., Merenkova I.N., Oretskaya T.S., Krynetskaya N.F., Ivanovskaya M.G., Vasseur M., Shabarova Z.A. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 5403–5407.
19. Каневский И.Э., Кузнецова С.А., Шабарова З.А. // Молекулярная биология. 1996. Т. 30. В печати.
20. Shabarova Z.A. // Biochimie. 1988. V. 70. P. 1323–1334.
21. Matteucci M.D., Caruthers M.H. // J. Am. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 3185–3191.
22. Maxam A.M., Gilbert W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 560–564.
23. Ashley G.W., Kushlan D.M. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 2927–2933.
24. Кузнецова С.А., Каневский И.Э., Флорентьев В.А., Мирзабеков А.Д., Шабарова З.А. // Молекулярная биология. 1994. Т. 28. С. 290–298.
25. Волков Е.М., Романова Е.А., Круг А., Орецкая Т.С., Потапов В.К., Шабарова З.А. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. С. 1034–1039.
26. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. // Current Protocols in Molecular Biology. N.Y.: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1989.

Synthesis and Properties of Covalently Closed DNA Duplexes Containing Pyrophosphate and Substituted Pyrophosphate Internucleotide Groups

S. A. Kuznetsova, I. E. Kanevskii, T. S. Oretskaya, and Z. A. Shabarova

Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

Abstract—A new method for the efficient synthesis of covalently closed DNA duplexes (DNA dumbbells) and the introduction of pyrophosphate and substituted pyrophosphate internucleotide groups into their structure is proposed. The method is based on chemical ligation in DNA duplexes that are formed by a polynucleotide the ends of which are brought together due to the introduction of the minihairpin structure $\begin{matrix} 5' \text{ GTA} \\ 3' \text{ CAA} \end{matrix} \text{A}$. DNA dumbbells containing a pyrophosphate (substituted pyrophosphate) group result from the interaction as being between the 3'-terminal phosphate (methylphosphate) group of the polynucleotide and the 5'-terminal phosphate group of deoxyguanosine of the minihairpin sequence, which flanks the polynucleotide from the 5' end. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide was used as a condensing agent. The yield of covalently closed 42-mer DNA duplexes containing a pyrophosphate group was 98%, that of duplexes with a substituted pyrophosphate group was 25%. The reactivity of the substituted pyrophosphate group incorporated into DNA dumbbells was studied. It is shown that the group efficiently interacts with nucleophiles in an aqueous medium at pH 8.0.

Key words: covalently closed DNA duplex, pyrophosphate and substituted pyrophosphate internucleotide groups, minihairpin structure, chemical ligation.