



УДК 517.113.4

ХИМИЧЕСКОЕ ЛИГИРОВАНИЕ И РЕКОМБИНАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ПОСРЕДСТВОМ ОБРАЗОВАНИЯ (ОБМЕНА) ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ, ЛОКАЛИЗОВАННЫХ В САХАРОФОСФАТНОМ ОСТОВЕ

© 2000 г. Н. Г. Долинная[#], В. Г. Метелев*Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 17.05.99 г. Принята к печати 15.12.99 г.

Разработаны удобные и эффективные методы направленного введения дифосфорилдисульфидных мостиков в шпильчатые ДНК-дуплексы вместо природных фосфодиэфирных связей с помощью химического лигирования 3'- и 5'-тиофосфорилированных олигонуклеотидов под действием перекиси водорода либо аутолигированием преактивированного олигонуклеотидного производного с олигомером, несущим тиофосфатную группу. Охарактеризована постсинтетическая рекомбинация дисульфидсвязанных олигонуклеотидных фрагментов. Показано, что параллельно с матричнонаправленными реакциями может осуществляться внедуплексное образование и обмен дифосфорилдисульфидных связей, локализованных в сахарофосфатном остове ДНК. В модифицированных шпильчатых ДНК спонтанный обмен дисульфидсвязанных фрагментов практически не происходит из-за внутримолекулярного комплексообразования.

Ключевые слова: шпильчатые ДНК-дуплексы; олигонуклеотид-3'(5')-тиофосфаты, химическое лигирование; дисульфидные связи в олигонуклеотидах.

ВВЕДЕНИЕ

Технология создания модифицированных субстратов на основе одно- или двуспиральных олигонуклеотидов для регуляции генной экспрессии и изучения механизма действия ферментов нуклеинового обмена находится в стадии становления. В последнее десятилетие это направление получило широкое развитие благодаря совершенствованию автоматического синтеза ДНК и РНК, а также появлению новых постсинтетических методов направленного введения модифицированных фрагментов в одно- и двуспиральные олигонуклеотиды. В частности, был предложен оригинальный подход к получению химически активных ДНК-субстратов, способных образовывать ковалентные связи с аминокислотными остатками белка непосредственно в белково-нуклеиновом комплексе, причем без дополнительных внешних воздействий [1, 2]. Метод заключается в синтезе модифицированных по концевым звеньям олигонуклеотидов с последующим их лигиро-

ванием на комплементарной матрице под действием химических реагентов. При этом характер модификации олигонуклеотида определяет тип образующейся межнуклеотидной связи, а первичная структура дуплексов задается нуклеотидной последовательностью участка узнавания белка. ДНК- и РНК-дуплексы с тризамещенными пирофосфатными [1–3] или ацилфосфатными [4] межнуклеотидными группами, способные ковалентно связываться с белками через остатки лизина или гистидина, были успешно использованы для аффинной модификации ферментов рестрикции-модификации [1, 5], фактора транскрипции человека NF-κB [2, 6] и РНК-узнающего Tat-пептида вируса иммунодефицита человека [7].

В настоящем исследовании получен другой тип реакционноспособных ДНК-дуплексов, содержащих единичные дифосфорилдисульфидные

$$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{OP} - \text{SS} - \text{PO} \\ | \quad \quad \quad | \\ \text{O}^- \quad \quad \quad \text{O}^- \end{array}$$
связи вместо природных фосфоди-

эфирных (предварительное сообщение опубликовано в работе [8]). В последние годы постоянно растет интерес исследователей к дисульфидсодержащим аналогам нуклеиновых кислот, поскольку межцепочечные дисульфидные сшивки позволяют исследовать третичную структуру и контролировать конформационную свободу биополимеров [9–17]. Особое место занимают иссле-

Сокращения: MES – морфолиноэтансульфокислота; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, гидрохлорид; Sp(i) или (i)pS – 5'- или 3'-тиофосфорилированный олигонуклеотид (i), (i)pSSp(j) (гетеродимер) – олигонуклеотиды (i) и (j), соединенные (3'-5')-дифосфорилдисульфидным мостиком; (i)pSSp(i) (гомодимер) – бис(олигонуклеотид (i))-(3'-3')- или (5'-5')-дифосфорилдисульфид.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-54-07; факс: (095) 939-31-81; e-mail: dolinnaya@biorg.chem.msu.su).

дования, в которых сам процесс образования дисульфидной связи дает информацию о внутри- или межмолекулярной структуре изучаемого объекта. Так, образование дисульфидных связей, направляемое супрамолекулярными взаимодействиями, было использовано для исследования степени сближения определенных участков в рибозимах и оценки конформационной гибкости больших молекул РНК [18]. С помощью аналогичных реакций доказана специфичность связывания модифицированного олигонуклеотидного лиганда (в состав которого входит тиольный аналог гуанина) с активным центром ДНК-метилгуанин-метилтрансферазы, содержащим остаток цистеина [19]. Описаны внутридуплексные реакции, в результате которых дисульфидный мостик направленно вводится в различные участки нуклеиновых кислот: сахарофосфатный остов [20], между гетероциклическими основаниями одной цепи [21] или комплементарных цепей ДНК [17], с локализацией дисульфидной связи в большой [11] или малой [16] бороздках двойной спирали. Имеются данные о соединении дисульфидными связями пространственно сближенных рибозных или урацильных остатков в РНК [15, 18] и аналогов цитозина в рибонуклеотидных мини-шпильках [14]. Как правило, во всех этих исследованиях используется то обстоятельство, что супрамолекулярные взаимодействия либо ускоряют реакцию между тиольными группами и их производными, либо препятствуют ее протеканию.

Как уже отмечалось, в настоящем исследовании получены реакционноспособные ДНК-дуплексы, содержащие единичные дифосфорилдисульфидные связи. Предполагается, что такая группировка способна взаимодействовать с тиольной группой остатков цистеина в белково-олигонуклеотидном комплексе, образуя фосфорилдисульфидную связь между белком и ДНК по механизму тиол-дисульфидного обмена (цистеин часто встречается в активных центрах многих НК-связывающих белков). Возможность образования дисульфидной сшивки между пиридилдисульфидным производным олигонуклеотида и цистеинсодержащим пептидом была показана Чу и Оргелом [22], при этом ковалентное связывание между компонентами не направлялось специфическим комплексообразованием. Наш подход заключается в том, что реакционноспособные дисульфидные связи вводятся непосредственно в сахарофосфатный остов ДНК-дуплекса, узнаваемого ДНК-связывающим доменом белка. Образование дисульфидных мостиков достигается окислением или тиофосфорил-дисульфидным обменом двух tandemно расположенных на комплементарной матрице олигонуклеотидов, содержащих 3'- и 5'-тиофосфорильные группы или их производные.

Наряду с обычными дуплексами использовались шпильчатые формы двойных спиралей, концы которых соединены тринуклеотидной петлей ААА, обеспечивающей максимально устойчивую структуру шпильки [23]. Такие самоскладывающиеся зонды термически значительно устойчивее соответствующих нешпильчатых структур. Они не претерпевают диссоциации до взаимодействия с белками-мишенями и их температура плавления не зависит от концентрации. При их применении необходимая для ингибирования белка концентрация зонда может быть существенно понижена, а повышенная устойчивость получаемых самостабилизированных дуплексов к нуклеазной деградации [24, 25] делает их более перспективными в качестве фармакологических агентов. Шпильчатая конформация олигонуклеотида более рациональна и для проведения химического лигирования. Поскольку такой олигомер объединяет в себе и матрицу, и входящий олигонуклеотид, существенно увеличивается термостабильность двойной спирали, внутри которой происходит химическая реакция.

Возможность лигирования 3'- и 5'-тиофосфатов олигонуклеотидов под действием $K_3[Fe(CN)_6]$ или KI_3 с образованием дифосфорилдисульфидных мостиков была продемонстрирована в работе [20]. Мы использовали более удобный и легко удаляемый реагент – перекись водорода в качестве окислителя и преактивированные фосфорилдисульфидные производные олигонуклеотидов, позволяющие соединять олигомерные фрагменты без дополнительных химических реагентов (аутолигирование). Особое внимание уделялось сравнительному изучению матричноконтролируемых и внедуплексных реакций образования и обмена дисульфидных связей, находящихся в сахарофосфатном остове олигодезоксирибонуклеотидов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн систем. В настоящем исследовании особое внимание было обращено на влияние комплементарной матрицы на процессы образования межнуклеотидной дифосфорилдисульфидной связи и последующей рекомбинации связанных дисульфидными мостиками олигонуклеотидных фрагментов. В связи с этим химическое лигирование проводилось параллельно в составе обычного ДНК-дуплекса **I** с удаляемой матрицей и в шпилькообразных двойных спиралах **II–IV** (схема 1), содержащих матрицу в составе одного из олигонуклеотидов. В структурах **II–IV** один из лигируемых олигонуклеотидов ((4), (5) или (6)) складывается сам на себя, образуя внутримолекулярную шпильку с петлей из трех остатков аденозина и одноцепочечным свисающим концом. Термическая устойчивость таких дуплексов не зависит от олигонуклеотидной концентрации, а тринуклео-

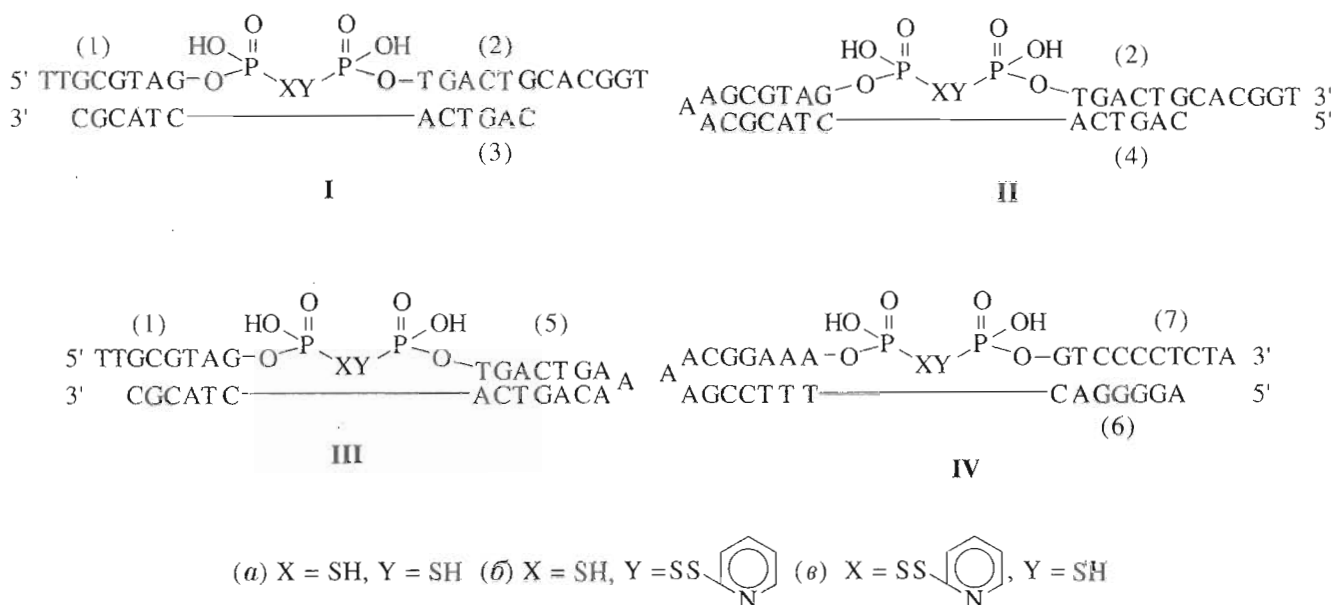


Схема 1.

тидная петля AAA способствует формированию чрезвычайно устойчивых мини-шпилек благодаря хорошему стэкинг-взаимодействию неканонической А·А-пары с оставшимся свободным аденозином [23]. Более короткий олигонуклеотидный фрагмент стыкуется со шпилечной структурой за счет комплементарных взаимодействий с одноцепочечным концом.

Последовательность нуклеотидных пар и место одноцепочечного разрыва дуплекса I и двуспиральных фрагментов шпилечных структур II и III одинаковы (дуплексы II и III различаются между собой положением тринуклеотидной петли AAA). Нуклеотидная последовательность шпилечного

дуплекса IV соответствует участку узнавания фактора транскрипции человека NF-κB, содержащего в активном центре остаток цистеина-59, который, как было показано с помощью рентгеноструктурного анализа, взаимодействует с межнуклеотидной фосфатной группой ДНК-субстрата [26].

С помощью УФ-спектроскопии была охарактеризована область термической устойчивости исследуемых дуплексов (рис. 1). В частности, было показано, что плавление шпилечной системы II (кривая 1) носит двухфазный характер: первая ступень (с температурой полуперехода 32°C) соответствует диссоциации более короткого олигонуклеотида (2), а вторая (72°C) – концентрационно независимому плавлению мини-шпилки, образованной фрагментом (4). В случае системы IV (кривая 2) температуры полупереходов обеих ступеней сближаются за счет обогащения G·C-парами двуспирального домена, образованного олигонуклеотидом (7) и свисающим концом шпилки (6). Суперпозиция этих переходов дает усредненную кривую плавления с эффективной $T_{пл}$ 59°C. Температура плавления дуплекса I равна 39°C.

Соединение фрагментов ДНК дифосфорилдисульфидными межнуклеотидными связями; химическое лигирование в дуплексе I и внедуплексные реакции. Для проведения первой серии экспериментов был использован дуплекс I, содержащий отделяющуюся матрицу. Под действием мягкого окислителя (0.03% H_2O_2) 3'-тиофосфорил-олигонуклеотид (1) и 5'-тиофосфорилолигонуклеотид (2), сближенные на комплементарной матрице, легко связываются дисульфидным мости-

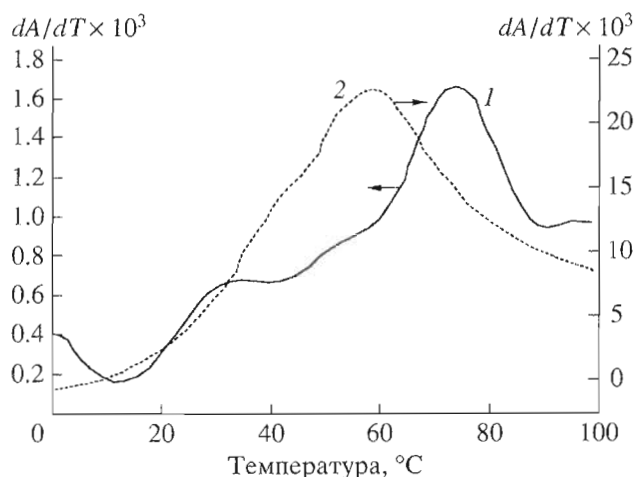


Рис. 1. Профили плавления (в дифференциальной форме) ДНК-дуплексов II (1) и IV (2) в буфере А (см. "Эксперимент. часть").

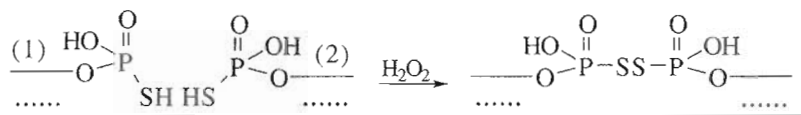


Схема 2.

ком (схема 2), образуя с 70–80%-ным выходом гетеродимерное производное (1)pSSp(2) (рис. 2, дорожка 1). Ковалентное связывание олигонуклеотидов происходит также и в отсутствие матрицы (3), хотя и с меньшей эффективностью. При этом наряду с гетеродимером образуются значительные количества гомодимеров (1)pSSp(1) и (2)pSSp(2). Накопление гомодимеров в реакционной смеси происходит также в случае избытка одного из тиофосфорилированных олигонуклеотидов (см. ниже).

С целью повышения селективности реакции, т.е. преимущественного получения гетеродимера, была сделана попытка заменить прямое окисление аутолигированием с использованием преактивированных производных олигонуклеотидов. Ранее было показано, что 2-пиридилдисульфидный (или фенилдисульфидный) аддукт олигонуклеотида легко обменивается со свободной тиольной группой цистеина пептида [22] или с тиольной функцией, которая находится на алифатическом линкере, присоединенном к рибозному фрагменту олигонуклеотида [18], с образованием дисульфидного производного за счет тиол-дисульфидного обмена.

В нашем исследовании был успешно реализован тиофосфорил-дисульфидный обмен между тиофосфорильной группой одного олигонуклеотида и 2-пиридилдисульфидным аддуктом другого, что привело к получению дисульфидсвязанных соединений. Преактивированные аддукты легко образуются при обработке 3'- или 5'-тиофосфорилированных олигонуклеотидов 2,2'-дипиридилдисульфидом. Они стабильны в условиях хроматографического и электрофоретического разделения и могут храниться в водных растворах при -10°C 2–3 недели. В результате матричнонаправленного аутолигирования (1)pS с 5'-(2-пиридил)дисульфидным аддуктом олигомера (2) и, наоборот, Sp(2) с 3'-(2-пиридил)дисульфидным аддуктом олигомера (1) (схема 1 (б) и (в) соответственно, схема 3) с выходом 80% был получен гетеродимер (1)pSSp(2) (рис. 2, дорожки 4 и 5). Как видно из электрофореграммы, эффективность лигирования не зависит от того, к какому концу (3' или 5') олигонуклеотида присоединена 2-пиридилдисульфидная группа.

Замена 5'-тиофосфата на 5'-фосфат в олигонуклеотиде (2) полностью блокирует ковалентное связывание с преактивированным производным олигомера (1) (рис. 2, дорожка 3). В то же

время отсутствие матрицы (3) лишь незначительно снижает эффективность тиофосфорил-дисульфидного обмена (рис. 2, дорожка 2). Однако в этом случае, как и при окислении перекисью водорода, наряду с целевым гетеродимером отмечается накопление гомодимерных продуктов. Поскольку реагирующие функциональные группы – тиофосфатная и 2-пиридилдисульфидная – находятся в разных олигонуклеотидах, в результате лигирования должны образовываться исключительно гетеродимеры даже в отсутствие комплементарной матрицы. По-видимому, накопление гомодимеров в реакционной смеси, не содержащей матричного олигонуклеотида, объясняется постсинтетической рекомбинацией гетеродимерного продукта. При этом свободный тиофосфорилированный олигонуклеотид вступает во вто-

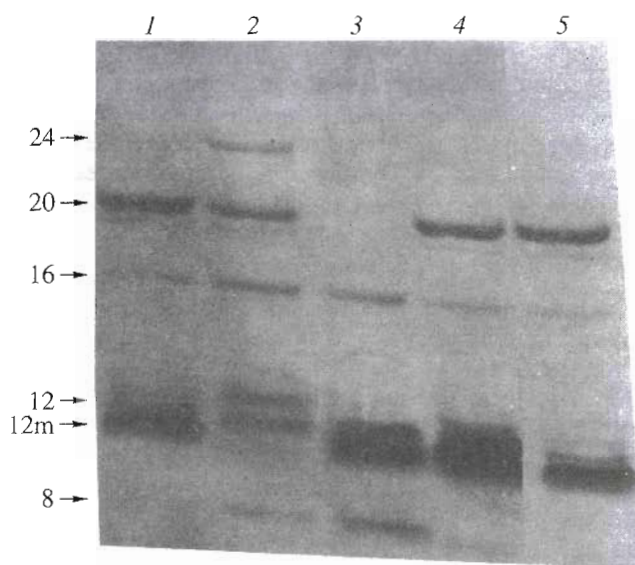


Рис. 2. Электрофоретический анализ образования дисульфидной связи между олигонуклеотидами (1) и (2). H_2O_2 -индуцируемая димеризация в присутствии матричного олигомера (3) (дорожка 1). Матричноконтролируемое аутолигирование 5'-(2-пиридил)дисульфидного аддукта олигомера (2) с (1)pS (дорожка 4) и 3'-(2-пиридил)дисульфидного аддукта олигомера (1) с Sp(2) (дорожка 5). Аутолигирование 3'-(2-пиридил)дисульфидного аддукта олигомера (1) с Sp(2) в отсутствие матрицы (3) (дорожка 2). Для сравнения, димеризация 3'-(2-пиридил)дисульфидного аддукта олигомера (1) и 5'-фосфорилированного олигонуклеотида (2) показана на дорожке 3. Условия реакции см. "Эксперимент. часть". Длина олигонуклеотидной цепи указана слева; 12m соответствует 12-звенной матрице, не изменяющейся в ходе реакции.

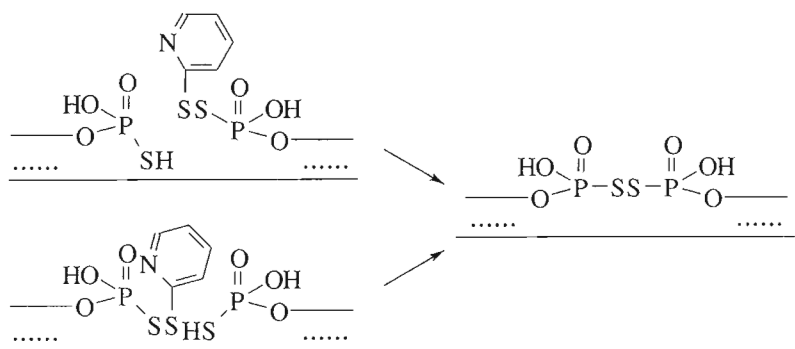


Схема 3.

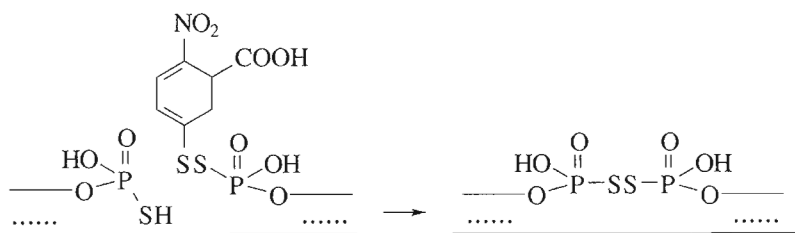


Схема 4.

ричный тиофосфорил-дисульфидный обмен, используя в качестве дисульфидного компонента образовавшийся гетеродимер. Учитывая эти данные, следует ожидать, что после выделения целевого продукта в индивидуальном состоянии (т.е. отделения его от матричного олигонуклеотида) он будет подвергаться диспропорционированию с образованием равновесной смеси соответствующих гомо- и гетеродимеров.

Матричноконтролируемое образование дифосфорилдисульфидных связей в шпилечных дуплексах II–IV. Было показано, что окисление перекисью водорода сближенных на комплементарной матрице 3'- и 5'-тиофосфатов олигонуклеотидов (схемы 1 (а), 2), присутствующих в реакционной смеси в эквимольном соотношении, приводит к 90%-ному образованию дисульфидсвязанных гетеродимеров (2)pSSp(4), (1)pSSp(5) и (6)pSSp(7). В то же время в случае избытка одного из дуплексообразующих олигомеров, гомодимер, состоящий из этого компонента, образуется наряду со шпилечным продуктом, контролируемым комплементарным спариванием. Так, при смешивании олигомеров (2) и (4) в соотношении 1 : 1.2 (дуплекс II) вместе с целевым гетеродимерным продуктом накапливался гомодимер (4)pSSp(4) (рис. 3, дорожка 2).

Очевидно, что в случае шпилечных структур использование преактивированных олигонуклеотидов, избирательно реагирующих с тиофосфорилированными производными, будет повышать селективность синтеза гетеродимеров. При этом

внутренняя комплементарная матрица не только обеспечивает сближение реакционноспособных групп олигонуклеотидов, но и предохраняет образовавшийся дисульфидсвязанный гетеродимер от последующей рекомбинации. Так, было показано, что 2-пиридилдисульфидные аддукты олигомеров (1) или (7) легко вступают в матричноконтролируемый тиофосфорил-дисульфидный обмен с Sp(5) или (6)pS соответственно (схемы 1 (б) или (в) и 3), образуя дисульфидсвязанные гетеродимеры (1)pSSp(5) и (6)pSSp(7) с выходом 80–90% (рис. 3, дорожки 3 и 4). Замена 2-пиридилдисульфидной группы на 3-карбокситетрагидропиридилдисульфидную (такой аддукт получается путем обработки Sp(7) реактивом Эллмана) (схема 4) существенно не влияет на эффективность образования (6)pSSp(7) (рис. 3, дорожка 5).

Постсинтетическая рекомбинация олигонуклеотидных фрагментов, соединенных дисульфидной связью. При анализе с помощью ион-парной ВЭЖХ электрофоретически гомогенного реакционного продукта (1)pSSp(2) на хроматограмме было обнаружено три пика, площади которых соотносились примерно как 1 : 2 : 1 (рис. 4а). То, что каждый из компонентов этой смеси представляет собой связанные дисульфидной связью комбинации олигомеров (1) и (2), подтверждается тем, что после обработки дитиотреитом триплет полностью трансформируется в два пика, соответствующие исходным тиофосфорилированным олигонуклеотидам (1) и (2) (рис. 4б). Пики (а) и (с) были идентифицированы как гомодимеры (1)pSSp(1) и

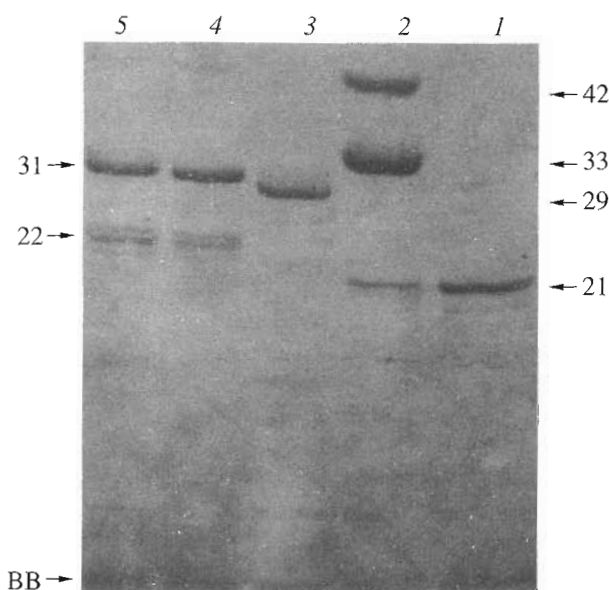


Рис. 3. Электрофоретический анализ дисульфидсвязанных продуктов лигирования олигонуклеотидов в шпильчных ДНК-дуплексах. H_2O_2 -индуцируемое лигирование (4)pS и Sp(2) (дорожка 2); контрольный (4)pS (дорожка 1). Аутолигирование 3'-(2-пиридил)дисульфидного аддукта олигомера (1) с Sp(5) (дорожка 3). Аутолигирование Sp(7) с 3'-(2-пиридил)дисульфидным аддуктом олигомера (6) (дорожка 4) или с 3'-(3-карбок-си-4-нитрофенил)дисульфидным аддуктом олигомера (6) (дорожка 5). Условия реакций см. [33]. Указана длина олигонуклеотидов.

(2)pSSp(2) соответственно сравнением с хроматографическими профилями контрольных гомодимеров (рис. 4а, в, г). Средний пик (b) может быть приписан гетеродимеру (1)pSSp(2). Возможно, смесь гомо- и гетеродимеров образуется в результате спонтанного дисульфидного обмена после денатурации двуспиральной структуры. Случайный разрыв дисульфидной связи в гетеродимере приводит к высвобождению олигонуклеотида с концевой тиофосфатной функцией, который реагирует с другой молекулой гетеродимера. Степень конверсии близка к статистическому пределу 50%, ожидаемому для реакции случайного распределения. Когда продукт реакции, проявляющийся на хроматограмме как триплет, был гибри-дизован с комплементарной матрицей и выдер-жан 16 ч в условиях, стабилизирующих двойную спираль, фракция гомодимеров уменьшалась с 47 до 25% (рис. 4а и д). Анализ ион-парной ВЭЖХ полной реакционной смеси (содержащей матрич-ный олигонуклеотид (3)), показывает наличие единственного продукта лигирования, соответ-ствующего гетеродимеру (1)pSSp(2). Согласно этим данным, обратный дисульфидный обмен иниции-руется образованием стабильного комплекса ге-теродимерного компонента смеси с матрицей, сдвигая равновесие в сторону накопления гетеро-

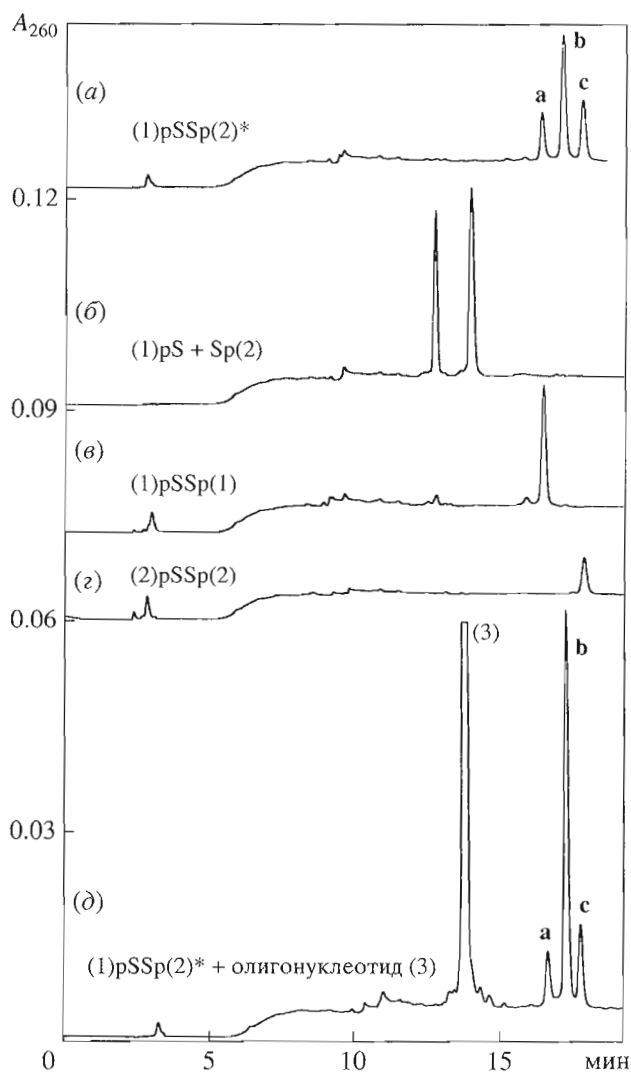


Рис. 4. Ион-парная ВЭЖХ дисульфидсвязанных олиго-нуклеотидов (1) и (2). Электрофоретически гомоген-ный продукт лигирования, полученный в дуплексе I до (профиль а) и после обработки дитиотреитом (про-филь б). Тот же продукт, гибридованный с компле-ментарной матрицей (3) и выдержанный 16 ч в усло-виях комплексообразования (профиль д). Гомодиме-ры (1)pSSp(1) (профиль в) и (2)pSSp(2) (профиль г). Обозначения олигонуклеотидных производных даны над профилями; (1)pSSp(2)* обозначает продукты ди-сульфидного обмена в гетеродимере (1)pSSp(2). Ус-ловия хроматографии см. "Эксперимент. часть".

димера. Очевидно также, что шпильчные ДНК, содержащие дисульфидную сшивку в одной из це-пей двуспирального домена, защищены от спон-танной рекомбинации олигонуклеотидных бло-ков. Действительно, в отличие от неструктуриро-ванных одноцепочечных олигонуклеотидов, дисульфидсодержащие ДНК-шпильки (2)pSSp(4), (1)pSSp(5) и (6)pSSp(7) демонстрируют практиче-ски индивидуальные пики на хроматограмме с не-значительными примесями гомодимеров (рис. 5).

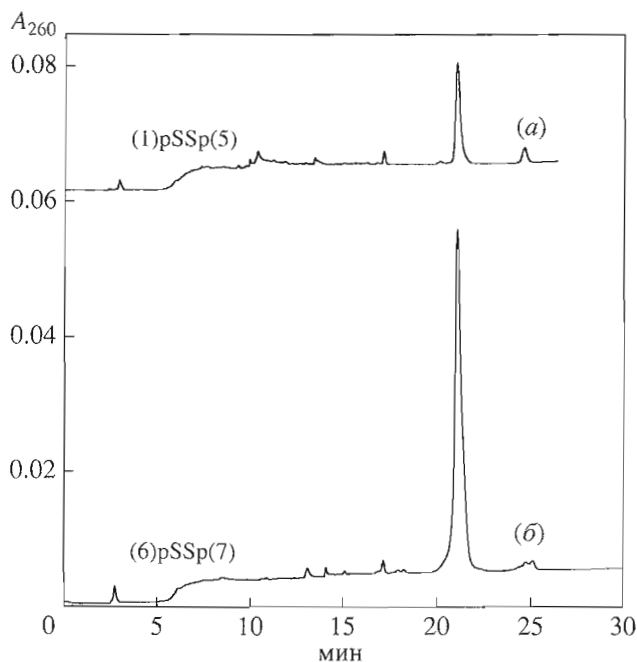


Рис. 5. Ион-парная ВЭЖХ дисульфидсвязанных продуктов реакции, полученных в дуплексах III (а) и IV (б). Обозначения олигонуклеотидных гетеродимеров даны над профилями. Условия хроматографии см. "Эксперимент. часть".

По-видимому, степень постреакционного дисульфидного обмена обратно пропорциональна стабильности двойной спирали.

Заключение

"Классическое" химическое лигирование [27–30], при котором образование новой межнуклеотидной связи, протекающее с участием активных групп, предварительно вводимых в олигонуклеотиды (имидазолиды, *N*-оксибензотриазоловые фосфодиэфиры) или непосредственно генерируемых под действием водорастворимых конденсирующих реагентов (BtCN, EDC), происходит только в супрамолекулярных ансамблях нуклеиновых кислот и является тестом на их стабильность [30]. В отличие от него образование дифосфорилдисульфидной связи между серосодержащими олигонуклеотидными производными подчиняется другим закономерностям. Согласно литературным данным [20–22] и результатам, полученным в нашей работе, параллельно с матричнонаправляемыми реакциями протекает и внедуплексная димеризация тиофосфорилированных олигонуклеотидов или их преактивированных производных. Кроме того, было показано, что эффективность образования дисульфидной связи не зависит от природы сшиваемых звеньев, оставаясь стабильно высокой. Это связано, по-видимому, с высокой реакционной способностью тиофосфорилированных

олигонуклеотидов в окислительной среде, так что скорость образования дисульфидной связи лимитируется главным образом скоростью, с которой реагирующие вещества диффундируют в направлении друг к другу. То же справедливо и для реакций тиол-дисульфидного обмена с участием дипиридилдисульфидных аддуктов олигонуклеотидов. При этом комплементарная матрица не столько ускоряет реакцию, увеличивая локальную концентрацию реагирующих компонентов, сколько повышает ее селективность.

В данной работе были предложены технологичные и эффективные методы введения реакционноспособных дифосфорилдисульфидных мостиков в заданное положение сахарофосфатного остова шпилечных ДНК-дуплексов и охарактеризовано диспропорционирование дисульфидсвязанных олигонуклеотидных фрагментов. Проведено сравнительное изучение эффективности и селективности матричнонаправленных и внедуплексных реакций такого рода. Показано, что селективно модифицированные шпилечные ДНК, имеющие повышенную термостабильность и устойчивость к нуклеазной деградации, предотвращают процессы диспропорционирования, оставаясь химически активными по отношению к донорам сульфгидрильных групп. Этот комплекс свойств делает шпилечные ДНК с дифосфорилдисульфидными связями удобными реагентами для ковалентного связывания с цистеинсодержащими белками (ферментами) внутри специфического белково-нуклеинового комплекса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды с 3'- или 5'-тиофосфорильными группами были синтезированы как описано в работе [31] и хранились в прокипяченной воде во избежание их окисления растворенным кислородом до дисульфидсвязанных димеров. Если это все же происходило, то димеры превращали в исходные соединения обработкой 0.05 М раствором дитиотреита в течение 1 ч при 20°C, которые затем выделяли осаждением этанолом по стандартной методике.

Матричнонаправленное лигирование 3'- и 5'-тиофосфорилированных олигонуклеотидов под действием H_2O_2 . Дуплексообразующие олигонуклеотиды были смешаны в 0.05 М MES, pH 7.0, 0.02 М $MgCl_2$ (буфер А); общая нуклеотидная концентрация составляла 1 мМ (на мономерное звено). Более короткий олигомер был добавлен в 1,2-кратном избытке (если не оговорено особо) по отношению к образующему шпильку олигонуклеотиду (дуплексы II–IV). В трехкомпонентном дуплексе I соотношение количеств олигомеров (1)–(3) составляло 1 : 1.3 : 1.5. После отжига и охлаждения до 0°C к реакционной смеси был добавлен раствор H_2O_2 до конечной концентрации

0.03%; реакция продолжалась 1 ч при 0°C. Затем олигонуклеотиды осаждали этанолом и анализировали гель-электрофорезом в 20%-ном денатурирующем ПААГ с регистрацией полос под УФ-светом либо ионообменной ВЭЖХ на колонке SCOUT WP PEI (5 мкм, 4.6 × 50 мм, J.T. Barker), используя градиент фосфата калия (рН 7.0; 5 мМ → 0.5 М) в 25% ацетонитриле; скорость элюции – 0.5 мл/мин. Выход продуктов реакции здесь и далее определяли по данным ВЭЖХ. После элюции из геля с помощью 10 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 0.3 М NaCl, 1 мМ EDTA в течение ночи при комнатной температуре продукты реакции осаждали этанолом.

Матричнонаправленное аутолигирование двух олигонуклеотидных производных с помощью реакции тиофосфорил-дисульфидного обмена. 3'-(или 5'-) Тиофосфорилированные олигонуклеотиды (1–5 ОЕ₂₆₀) были превращены в 2-пиридил- или 3-карбокси-4-нитрофенилдисульфидные производные обработкой соответственно 0.03 М 2,2'-дипиридилдисульфидом или реактивом Эллмана [32] в 2.5 мМ Трис-НСl (рН 7.5), содержащем 50% DMF, в течение 3 ч при комнатной температуре. Эти производные, полученные с 95% выходом, были выделены из реакционной смеси осаждением этанолом. Затем каждый олигонуклеотид был смешан с другим дуплексобразующим компонентом (компонентами) в буфере А. Реакционная смесь после отжига и охлаждения была инкубирована 16 ч при 0°C. Анализ проводили как описано выше.

Расщепление дифосфорилдисульфидных связей, т.е. превращение олигонуклеотидного димера в исходные тиофосфорилированные олигонуклеотиды, проводили действием 0.05 М дитиотреита (1 ч, 20°C). Продукты расщепления обессолили с помощью осаждения этанолом и анализировали ион-парной ВЭЖХ (Waters) при 45°C в градиенте ацетонитрила (5 → 40%) в 48 мМ фосфате калия (рН 7.0), содержащем 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламмония, как описано в работе [33]. Скорость элюции составляла 1 мл/мин.

Профили плавления олигонуклеотидных дуплексов в буфере А регистрировали на спектрофотометре "Hitachi 150-20", оснащенном контроллером температуры SPR-10; температуру в интервале 2–85°C повышали непрерывно со скоростью 0.5 град/мин. Концентрация олигонуклеотидов (0.1 мМ, в расчете на мономерное звено) определялась спектрофотометрически. Для плавления использовали 3'(5')-фосфаты олигонуклеотидов вместо 3'(5')-тиофосфатов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант

№ 98-04-49166) и Российской государственной программы по поддержке научных школ (№ 96-15-97707).

Авторы выражают благодарность Т.С. Орещкой за предоставленные олигодезоксирибонуклеотиды и В.Н. Ташлицкому за анализ реакционных смесей ион-парной ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Purmal A.A., Shabarova Z.A., Gumpert R.I. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 3713–3719.
2. Kozlov I.A., Kubareva E.A., Ivanovskaya M.G., Shabarova Z.A. // Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 1997. V. 7. P. 279–289.
3. Kuznetsova S.A., Clusel C., Ugarte E., Elias I., Vasseur M., Blumenfeld M., Shabarova Z.A. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 4783–4790.
4. Ивановская М.Г., Козлов И.А., Кубарева Е.А., Таран Е.А., Серазев Т.В., Шабарова З.А. // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. С. 436–445.
5. Sheflyan G.Ya., Kubareva E.A., Kuznetsova S.A., Karyagina A.S., Nikolskaya I.I., Gromova E.S., Shabarova Z.A. // FEBS Lett. 1996. V. 390. P. 307–310.
6. Козлов И.А., Кубарева Е.А., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31. С. 63–73.
7. Naryshkin N.A., Farrow M.A., Ivanovskaya M.G., Oretskaya T.S., Shabarova Z.A., Gait M.J. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 3496–3505.
8. Dolinnaya N., Metelev V., Oretskaya T., Tabatadze D., Shabarova Z.A. // FEBS Lett. 1999. V. 444. P. 285–290.
9. Cain R.J., Zuiderweg E.R.P., Glick G.D. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 2153–2160.
10. Ferentz A.E., Wiorkiewicz-Kuczera J., Karplus M., Verdine G.L. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 7569–7583.
11. Ferentz A.E., Verdine G.L. // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 4000–4002.
12. Cain R.J., Glick G.D. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 836–842.
13. Cain R.J., Glick G.D. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 1456–1464.
14. Allerson C.R., Verdine G.L. // Chem. Biol. 1995. V. 2. P. 667–675.
15. Maglott E.J., Glick G.D. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 1301–1308.
16. Erlanson D.A., Chen L., Verdine G.L. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 12583–12584.
17. Erlanson D.A., Glover J.N.M., Verdine G.L. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 6927–6928.
18. Cohen S.B., Cech T.R. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 6259–6268.
19. Paalman S.R., Noll D.M., Clarke N.D. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 1795–1801.
20. Gryaznov S., Letsinger R.L. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 1403–1408.
21. Ueno Y., Nakagawa A., Matsuda A. // Nucleosides Nucleotides. 1998. V. 17. P. 283–289.

22. *Chu B.C.F., Orgel L.E.* // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 3671–3691.
23. *Chou S.-H., Zhu L., Gao Z., Cheng J.-W., Reid B.R.* // J. Mol. Biol. 1996. V. 264. P. 981–1001.
24. *Chu B.C., Orgel L.E.* // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 5857–5859.
25. *Hirao I., Kawai G., Yoshizawa S., Nishimura Y., Ishido Y., Watanabe K., Miura K.* // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 576–582.
26. *Ghosh G., Duyn G.V., Ghosh S., Sigler P.B.* // Nature. 1995. V. 373. P. 303–310.
27. *Dolinnaya N.G., Sokolova N.I., Gryaznova O.I., Shabarova Z.A.* // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 3721–3738.
28. *Dolinnaya N.G., Sokolova N.I., Ashirbekova D.T., Shabarova Z.A.* // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 3067–3072.
29. *Долинная Н.Г., Шабарова З.А.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1996. Т. 45. С. 1889–1911.
30. *Шабарова З.А., Вейко В.П., Долинная Н.Г., Друца В.Л., Метелев В.Г., Орецкая Т.С., Пурмаль А.А.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 628–642.
31. *Метелев В.Г., Орецкая Т.С.* // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 490–494.
32. *Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B.* // Anal. Biochem. 1979. V. 94. P. 75–81.
33. *Тащлицкий В.Н., Орецкая Т.С.* // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 732–741.

Chemical Ligation and Recombination of DNA Fragments Through Formation (Exchange) of Disulfide Bonds Located in the Sugar-Phosphate Backbone

N. G. Dolinnaya[#] and V. G. Meteleev

Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

Effective methods of the directed introduction of diphosphoryl disulfide bridges into hairpin DNA duplexes in place of natural phosphodiester groups were developed using the H₂O₂-effected ligation of 3'- and 5'-thiophosphorylated oligonucleotides or the autoligation of a preactivated oligonucleotide derivative with a phosphorothioate-bearing oligomer. The postsynthetic recombination of the disulfide-linked oligonucleotide fragments was characterized. It was shown that, along with template-directed reactions, out-of-duplex formation and exchange of diphosphoryl disulfide bonds in the DNA sugar-phosphate backbone may occur. In modified hairpin DNA, a spontaneous exchange of disulfide-linked fragments virtually does not take place because of the intramolecular duplex formation.

Key words: chemical ligation, hairpin DNA duplexes, oligonucleotide disulfide bonds, oligonucleotide 3'(5')-phosphorothioates

[#] *To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 939-3181; phone +7 (095) 939-5407; e-mail: dolinnaya@biorg.chem.msu.su.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.