



УДК 577.113.4

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ УГЛЕВОДОРОДНЫЕ МОСТИКИ ВМЕСТО ОДНОГО ИЗ НУКЛЕОЗИДНЫХ ОСТАТКОВ

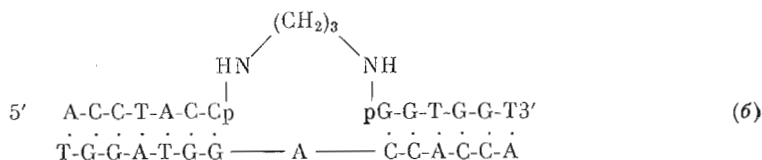
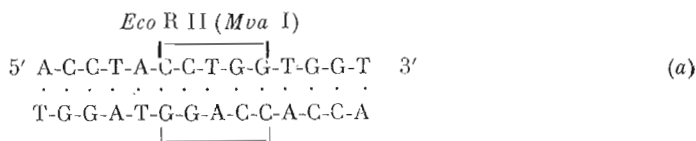
*Кузнецова С. А., Волков Е. М., Громова Е. С.,
Потанов В. Г., Шабарова З. А.*

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

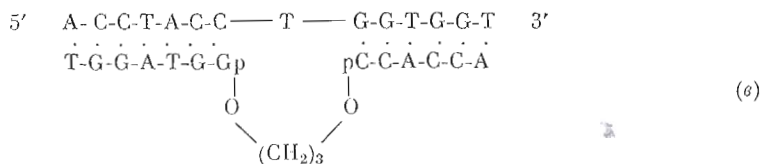
Описано получение синтетических ДНК-дуплексов, в которых остатки 1,3-пропандиола или 1,3-диаминопропана заменяют нуклеозидное звено в одной из комплементарных цепей дуплекса. Методами КД и УФ-спектроскопии показано, что внесенные модификации приводят к дестабилизации дуплексов на 18–20° С. Синтезированные дуплексы являются аналогами субстратов эндонуклеаз рестрикции *EcoRII* и *MvaI*.

Модифицированные ДНК-дуплексы, содержащие вместо одного из нуклеозидных остатков гибкую цепочку из нескольких метиленовых звеньев представляют интерес как аналоги фрагментов ДНК, в которых частично сохраняется углеводородный остов, но удаляется гетероциклическое основание. Встроенное звено не участвует в межплоскостных и уотсон-криковских взаимодействиях и обладает большей конформационной подвижностью. Недавно нами был описан синтез такого рода структур с использованием метода химического лигирования — конденсации олигонуклеотидных блоков на комплементарной матрице [1, 2]. Одновременно в литературе появились сообщения о синтезе олигонуклеотидов с встроенным в сахарофосфатный остов вместо остатков dA или dT 1,3-пропандиолом (мостиковой структурой), полученных прямым синтезом [3, 4]. Однако авторы работ [3, 4] встраивали остаток 1,3-пропандиола в самокомплементарные олигонуклеотиды, и в растворе полученные соединения с пропиленовым мостиком проявляли высокую тенденцию к образованию внутримолекулярных шпильчатых структур; получить межмолекулярные ДНК-дуплексы им не удалось.

Целью настоящей работы явился синтез и изучение физико-химических свойств ДНК-дуплексов, содержащих участок узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRII* и *MvaI* CC(A/T)GG, в которых одно из нуклеозидных звеньев заменено на остаток 1,3-пропиледамина (б) или 1,3-пропандиола (в):



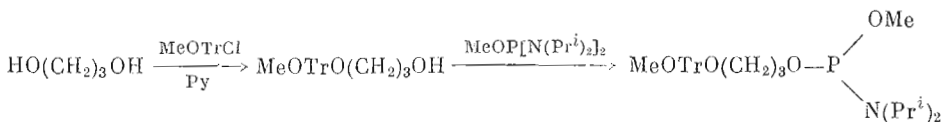
Индекс «d» (дезоксн) в изображении дезоксирибонуклеотидов опущен.



Замену проводили как в «верхней», так и в «нижней» цепи участка узнавания. Указанные модификации дают возможность выявить роль каждого из оснований в центральной вырожденной нуклеотидной паре участка узнавания во взаимодействии с указанными ферментами. Для такого рода исследований необходима информация о влиянии пропиленового мостика на устойчивость и конформацию двойной спирали, в связи с чем в данной работе изучено плавление модифицированных ДНК-дуплексов и их оптическая активность в условиях проведения ферментативных реакций.

Синтез немодифицированных тетрадекануклеотидов АССТАССТGGT-GGT (I) и АССАССАGGTAGGT (II), входящих в состав дуплекса (a), а также представляющих соответственно верхнюю и нижнюю цепи дуплексов (e) и (b), был осуществлен ранее фосфотриэфирным методом в растворе [5]. ДНК-дуплекс (b) был получен по описанной ранее методике [1, 2] путем химического лигирования олигонуклеотидов АССТАССpNH·(CH₂)₃NH₂ (III) с имидазолидом или N-оксибензотриазоловым эфиром гексануклеотида pGGTGGT (IV) на комплементарной матрице (II).

Модифицированный олигонуклеотид АССАССpO(CH₂)₃OpGGTAGGT (V), входящий в состав дуплекса (e), был синтезирован твердофазным методом по фосфитамидной схеме. Фосфитамидный метод синтеза позволяет встраивать остаток 1,3-пропандиола в структуру сахарофосфатного остатка олигодезоксирибонуклеотида в отсутствие комплементарной матрицы. Это является в данном случае важным преимуществом, поскольку синтез аналогичных олигонуклеотидов методом химического лигирования протекает со сравнительно низкой эффективностью [2]. Нарастание цепи осуществляли по стандартной методике на синтезаторе «Виктория-4М» [6]. Для введения триметиленового звена в качестве фосфитамидного компонента использовали 1-О-монометокситриил-3-О-(N,N-дизпропилами-до)метилфосфит пропиленгликоля [7], полученный по схеме



1-Монометокситриилпропандиол выделен с выходом 70%, фосфитамидная группа введена по стандартной методике [7] без дополнительной очистки с выходом 95%. Структура соединений доказана методом ИК- и ПМР-спектроскопии. Нуклеотидную последовательность соединения (V) подтверждали по методу Максама — Гилберта [8]. В качестве примера на рис. 1 представлен радиоавтограф гель-электрофореграммы, полученный при секвенировании тридекануклеотида (V). Как видно из рис. 1, в месте введения триметиленового звена отсутствует радиоактивность во всех четырех колонках геля. Поэтому нуклеотидная последовательность модифицированного олигонуклеотида читается как последовательность аналогичного немодифицированного тридекануклеотида. При обработке 5'-³²P-меченого (V) ФДЭ змеиного яда (КФ 3.1.4.1) протекал его неполный гидролиз; наряду с мононуклеотидом ³²pA образуется промежуточное соединение с подвижностью в ПААГ, соответствующей гексануклеотиду ³²pАССАССpO(CH₂)₃ОН, который был получен нами встречным синтезом. Гидролиз проводили с использованием минимальной концентрации ФДЭ, при которой немодифицированный олигонуклеотид (II) гидролизуются полностью. Наличие триметиленового звена в олигонуклеотиде (V) подтверждали также путем его исчерпывающего гидролиза смесью ФДЭ и фосфатазы (рис. 2) с последующим анализом гидролизата обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве контроля брали смесь нуклеозидов в соотношениях, соответствующих структуре аналогичного немодифицированного три-

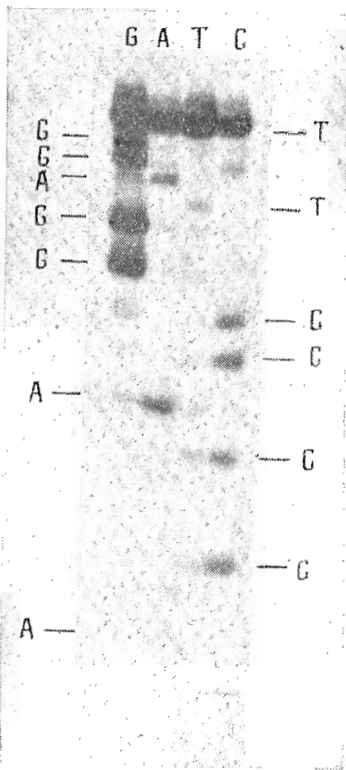


Рис. 1

Рис. 1. Анализ методом Максама - Гилберта нуклеотидной последовательности АССАССрО(СН₂)₃ОрGGTAGGT (V). Электрофорез в 20% ПААГ в 7 М мочевице

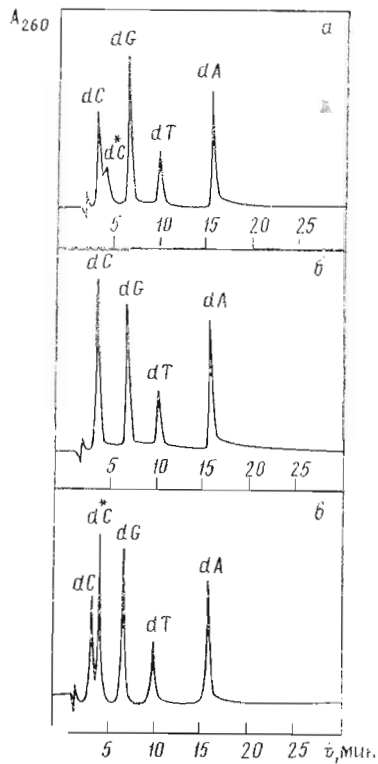


Рис. 2

Рис. 2. Анализ нуклеозидного состава АССАССрО(СН₂)₃ОрGGTAGGT (V). Профиль элюции продуктов исчерпывающего гидролиза олигонуклеотида (V) смесью ФДЭ змеиного яда и фосфатазы (а); контрольная смесь нуклеозидов в соотношении, отвечающем немодифицированному тридекануклеотиду АССАССGGTAGGT (б); гидролизат олигонуклеотида (V) + dC* (в); dC* - гидроксипропиловый эфир дезоксицитидин-3'-фосфата. Анализ проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе «Tracor» (Нидерланды) на колонке Ultrasphere TM-octyl (5 мкм, 4,6 мм×25 см) в линейном градиенте концентрации метанола (0,00-0,40 М), содержащего 0,1 М ацетат аммония. Скорость элюции 1 мл/мин

декануклеотида. В результате гидролиза одновременно с уменьшением высоты пика, соответствующего цитозину, появляется новый пик, идентичный по подвижности с синтезированным нами оксипропиловым эфиром цитидин-3'-фосфата (рис. 2). Аналогичный результат был получен в работе [3].

Для оценки влияния введенных модификаций на структуру двойной спирали в ДНК-дуплексах (б) и (в) были использованы методы УФ-спектроскопии и КД. Хотя эти методы не позволяют охарактеризовать локальные возмущения, вносимые остатками пропилендиамина или пропиленгликоля, они дают возможность выяснить, как влияют модификации на геометрию и термодинамические параметры дуплекса в целом.

На рис. 3 приведены кривые зависимости оптического поглощения от температуры для полученных дуплексов. Значения гинохромии комплексобразования, h , вместе с расчетными значениями ΔH° суммированы в таблице.

Форма кривых плавления (как в интегральном, так и в дифференциальном виде) свидетельствует об образовании во всех случаях комплементарных комплексов. Характер кривых плавления — однофазность и достаточно высокая кооперативность — свидетельствуют об отсутствии в этом случае шпильчатых структур, которые, как отмечалось выше, образыва-

Некоторые характеристики синтетических дуплексов

Дуплекс	h , %	т.пл. °С	ΔH° , кДж/моль
<i>a</i>	14±1	53±1	-483,6±5
<i>б</i>	14±1	35±1	-194,5±5
<i>в</i>	13±1	33±1	-132,5±5

лись в самокомплементарных олигонуклеотидах с триметиленовым мостиком [3]. Видно, что замена одного нуклеозидного звена в одной из цепей дуплекса (*a*) на остатки пропилендиамина (дуплекс (*б*)) или пропиленгликоля (дуплекс (*в*)) приводит к их дестабилизации на 18–20° С (рис. 3, таблица). Результат не является неожиданным, так как при таких заменах нарушаются уотсон-криковские взаимодействия и увеличивается конформационная подвижность групп атомов, прилегающих к модифицированному узлу. Кроме того, введение гидрофобного радикала изменяет полярность окружения оснований и фосфатных групп и также ведет к дестабилизации двойной спирали [9, 10]. Аналогичный эффект был отмечен при изучении комплексообразования комплементарных олигонуклеотидов, в которых одно нуклеозидное звено было заменено на 1,2-дидезокси-*D*-рибофуранозу и 1,2-дидезокси-1-фенил-β-*D*-рибофуранозу [11]. Следует отметить, что наблюдаемое нами понижение температуры плавления (таблица) является дополнительным доказательством существования гетеродуплексов (*б*) и (*в*), так как в случае образования шпилек температура плавления, напротив, должна повышаться [3].

Как уже отмечалось нами ранее [5], вид спектра КД немодифицированного дуплекса (*a*) отклоняется от канонического вида В-формы ДНК: увеличивается амплитуда положительной полосы КД, точка нулевого перехода смещена в коротковолновую область. На основании этого и результатов изучения олигонуклеотидных дуплексов с $\begin{matrix} -G-G- \\ -C-C- \end{matrix}$ кластерами

методом рентгеноструктурного анализа [12] было сделано предположение об А-подобной конформации дуплекса (*a*). Как видно из рис. 4 (кривая 1), амплитуда положительной и отрицательной полос КД модифицированного дуплекса (*в*) меньше амплитуды соответствующих полос дуплекса (*a*). Кроме того, появляется плечо в области 285 нм. Эти изменения, по-видимому, обусловлены увеличением конформационной подвижности групп атомов в центральной части молекулы за счет введения гибкого триметиленового звена. Тем не менее в целом вид спектра КД модифицированного двуспирального комплекса (*в*) напоминает соответствующий спектр комплекса (*a*). С увеличением температуры спектры КД дуплексов (*a*) и (*в*) изменяются (рис. 4). При температуре 32° С (ниже т. пл.) эти изменения еще невелики. При повышении температуры до 67° С, когда уже полностью завершён переход спираль — клубок, резко понижается амплитуда эффектов Коттона в области 220–300 нм для обеих систем, причем в спектре КД системы (*в*) сглаживается плечо, и спектры (*a*) и (*в*) становятся похожими.

Таким образом, нами было впервые показано, что при взаимодействии комплементарных олигонуклеотидов, один из которых несет вместо нуклеозидного звена (СН₂)₃-мостик, образуется обычный двухспиральный комплекс. Введение углеводородного мостика приводит к значительной дестабилизации ДНК-дуплекса. В связи с этим изучение субстратных свойств таких систем следует проводить при более низких температурах. Кроме того, используя эти дуплексы как апуриновые (апириимидиновые) аналоги ДНК, следует иметь в виду, что внесенные модификации, по-видимому, не приводят к существенному искажению геометрии двойной спирали в целом, за исключением локального увеличения конформационной подвижности молекулы.

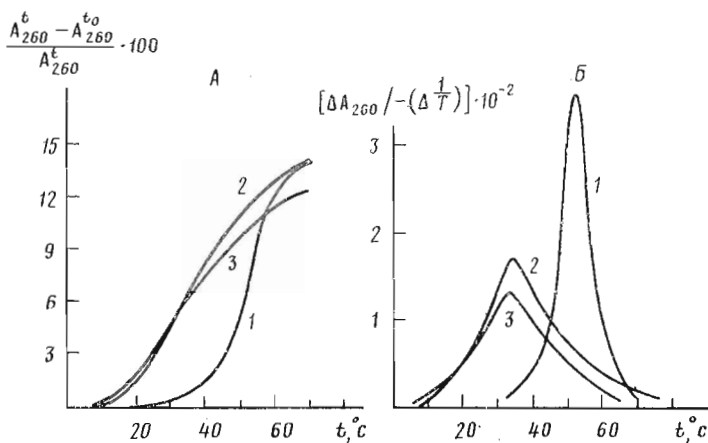


Рис. 3. Кривые плавления дуплексов (а) — 1, (б) — 2 и (в) — 3 в интегральной (А) и дифференциальной (Б) формах. Условия см. в «Экспериментальной части»

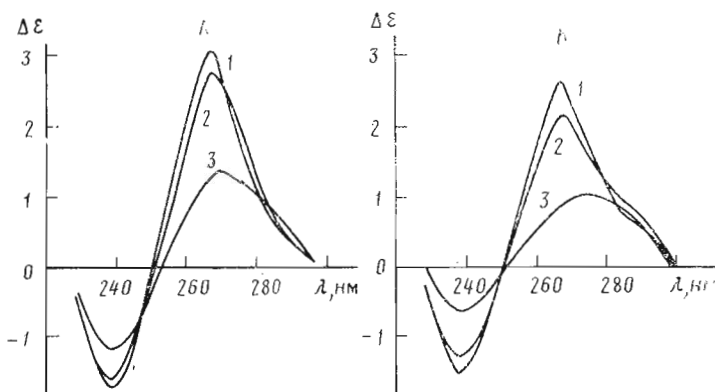


Рис. 4. Спектры КД дуплексов (а) — А и (б) — Б при температурах 7 (1), 32 (2), 67° С (3). Условия см. в «Экспериментальной части»

Экспериментальная часть

В работе использовали 2'-дезоксинуклеозиды и силкагель марки «Силохром С-80» отечественного производства, N-метилглимидазол, триизопропилбензолсульфонилхлорид, тетразол, аммиопропилтриэтоксилан, триметилхлорсилан, N-этилдизопропиламин (Fluka, Швейцария).

В работе использовали T4-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент», Вильнюс), фосфодизстеразу змеиного яда (Worthington Biochemical Corp., США), фосфомоноэстеразу (Sigma, США), 1,3-пропандиол (Ferak, ФРГ), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с удельной активностью 1000 Ки/ммоль (В/О «Изотоп»).

Подготовку растворителей и модификацию полимерного носителя осуществляли согласно [6].

Синтез гидроксипропилового эфира дезоксирибозитидин-3'-фосфата осуществляли на силкагеле «Силохром С-80». В качестве первого звена на полимер присоединяли остаток 1-монометокситригилпропандиола по методике [6]. Затем после удаления монометокситригильной группы к полимеру присоединяли остаток дезоксирибозитидина по стандартной фосфитамидной методике [6]. Выход гидроксипропилового эфира дезоксирибозитидин-3'-фосфата составил 80%. R_f 0,62 (ТСХ на целлюлозе, этанол — 1 М ацетат аммония, pH 7,5). R_f 0,76 (ТСХ на целлюлозе, n-пропанол — аммиак — вода, 55 : 10 : 35). При анализе методом ВЭЖХ гидроксипропиловый эфир дезоксирибозитидин-3'-фосфата (условия см. в подписи к рис. 2) имеет место выхода непосредственно за дезоксирибозитидином.

Синтез гидроксипропилового эфира гексануклеотида ACCACCpO(CH₂)₃OH осуществляли на автоматическом синтезаторе «Виктория 4М» на силкагеле «Силохром С-80». В качестве первого звена на полимер присоединяли остаток 1-монометокситригилпропандиола по методике [6]. Дальнейшее наращивание цепи проводили как в работе [6].

1-О-Монометокситригил-3-О-(N, N-дизопропиламино) метилфосфит пропиленгли-

коля. Смесь 3,08 г (10 ммоль) монометокситритилхлорида и 2,2 мл (30 ммоль) 1,3-пропиленгликоля в 10 мл абс. пиридина выдерживали 3 ч при 20° С. После упаривания пиридина смесь растворяли в 100 мл хлороформа и экстрагировали избыток 1,3-пропиленгликоля водой (3×50 мл), органический слой сушили Na₂SO₄.

1-Монометокситритилпропандиол выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента хлороформ. После упаривания растворителя продукт перекристаллизовывали из пентана. Выход 2,5 г (70%). *R_f* 0,29 (силуфол, CH₂Cl₂). ПМР (σ, CCl₄): 1,65 (2H, тт, CH₂, *J* 6,0 Гц); 2,0 (1H, с, OH); 3,12 (2H, т, CH₂, *J* 6,0 Гц); 3,53 (2H, т, CH₂, *J* 6,0 Гц); 3,62 (3 А, с, OCH₃); 6,5–7,4 (14 H, м, Ar).

1-Монометокситритилпропандиол (348 г, 1 ммоль) после высушивания в вакууме растворяли в 5 мл абс. хлористого метилена и прибавляли 86 мг (0,15 ммоль) тетразолида динизопропиламмония и 326 мкл (1,2 ммоль) бис(N,N-дизопропиламидо)метилфосфата. Реакцию проводили 1 ч при 20° С и далее обрабатывали реакционную смесь согласно работе [7]. Полученный фосфитамид без дополнительной очистки использовали в синтезе олигонуклеотида (V) в виде 0,1 М раствора в ацетонитриле. УФ (ЕЮН): λ_{max} 230,5 нм, λ_{min} 223 нм. *R_f* в CH₂Cl₂ (2% Et₃N) при ТСХ на силуфол (ЧССР) 0,32.

Тридекануклеотид ACCACCpO(CH₂)₃OpAGGTAGGGT(V) получали на силикагеле «Силохром С-80» (20 мг) с загрузкой первым нуклеозидом 46 мкмоль/г. Выход продукта (V) составил 19 или 89% на стадию. Реакция с модифицированным звеном проходила с тем же выходом (90%), что и с обычными фосфитамидными компонентами. Удаление защитных групп осуществляли согласно [6].

Выделение олигонуклеотида (V), содержащего монометокситритильную группу, проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ на приборе Altex (США), носитель — Lichrosorb С-18 (10 мкм), размер колонки 4,6×250 мм в градиенте концентрации ацетонитрила 0–40% в 0,05 М ацетате аммония, скорость элюции 1 мл/мин. Монометокситритильную группу удаляли 80% уксусной кислотой и олигонуклеотид выделяли электрофорезом в 20% ПААГ в 7 М мочевины.

Изучение образования комплексов олигонуклеотидами проводили в 0,04 М трис-буфере (рН 7,6), содержащем 0,05 М NaCl, 5 мМ MgCl₂, 7 мМ β-меркаптоэтанол. Концентрация олигонуклеотида на мономерное звено (с₀) составляла 0,3 мМ. Температурную зависимость УФ-поглощения комплексов измеряли на спектрофотометре Cary-219 (США) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,5° С в 1 мин. Гипохимию комплексообразования определяли из кривых плавления согласно следующему уравнению:

$$h = \frac{A_{260}^t - A_{260}^{t_0}}{A_{260}^t} \cdot 100,$$

где A_{260}^t и $A_{260}^{t_0}$ — поглощение раствора при температурах t и t_0 в °С соответственно (λ 260 нм). Значения энтальпии комплексообразования и температуры плавления рассчитывали по формулам

$$\Delta H^0 = - \frac{18,28}{\frac{1}{T_{1/2}} - \frac{1}{T_{3/4}}} \text{ и т. п. л.} = T_{1/2} \cdot \left(1 - \frac{T_{1/2}}{\Delta H^0} \right),$$

где $T_{1/2}$ и $T_{3/4}$ — температура в кельвинах в максимуме дифференциальной кривой и в точке, при которой $\Delta A/\Delta(T^{-1})$ опустилась на половину максимальной величины соответственно.

Спектры КД регистрировали на дихрографе «Roussel Jouan III» (Франция). Данные КД выражены в виде разностного циркулярно-дихроичного поглощения

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r = \frac{\Delta A}{c \cdot l},$$

где ε_l и ε_r — молярные коэффициенты поглощения левой и правой циркулярно-поляризованных форм света соответственно, ΔA — оптическое поглощение КД, c — концентрация (М), l — длина оптического пути (см), чувствительность измерений 5·10⁻⁶ ОЕ/мм.

Зависимость УФ-поглощения и КД от температуры изучали в термостатируемых кварцевых кюветах фирмы «Hellma» (ФРГ) с длиной оптического пути 1 мм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова С. А., Готлих М. Б. // 7 Респ. конф. молодых ученых-химиков. Тез. докл. Ч. 1. Таллин. 1987. С. 44.
2. Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Готлих М. Б., Елов А. А., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 490–499.
3. Seela F., Kaiser K. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 7. P. 3113–3129.
4. Seela F., Kaiser K. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1–2. P. 447–450.
5. Кузнецова С. А., Кубарева Е. А., Орецькая Т. С., Долинная Н. Г., Крынецкая Н. Ф., Громова Е. С., Шабарова З. А., Цех Д. // Биополимеры и клетка. 1987. Т. 3. № 6. С. 283–289.

6. Грязнов С. М., Чернов И. П., Потапов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабаров З. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604—1611.
7. Barone A. D., Tang I. Y., Caruthers M. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 12. P. 4051—4061.
8. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 3. P. 560—564.
9. Смирнов В. В., Громова Е. С., Нефедьева Н. Н., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Молекулярн. биология. 1978. Т. 12. № 2. С. 429—442
10. Гатинская Л. Г., Смирнов В. В., Соколова Н. П., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1973. Т. 212. № 2. С. 363—366.
11. Millican T. A., Mock G. A., Channsey M. A., Patel T. P., Eaton M. A. W., Gunning J., Gutbush S. D., Neidle S., Mann J. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 19. P. 7435—7453.
12. Shakked Z., Rabinovich D. // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. № 2. P. 183—201.

Поступила в редакцию
28.III.1988

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF DNA DUPLEXES CONTAINING HYDROCARBON BRIDGES INSTEAD OF A NUCLEOSIDE RESIDUE

KUZNETSOVA S. A., VOLKOV E. M., GROMOVA E. S., ПОТАПОВ В. К., ШАБАРОВА З. А

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

DNA duplexes 14 bp long containing an *Eco*RII and *Mva*I restriction site in which a nucleoside is substituted by 1,3-diaminopropane or 1,3-propanediol residue have been chemically synthesized. Diaminopropane bridge was introduced by the chemical ligation, whereas the oligonucleotide containing propanediol was prepared by automatic solid phase phosphoroamidite method on «Victoria-4M» synthesizer. As CD and UV spectra show, the modification destabilises the duplex by 18—20°C without essential distortion of the double helix, except for increase of the conformational mobility in the modified site.