

УДК 577.113.4: 577.152.314.14

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФОСФОРИЛДИСУЛЬФИДНУЮ ГРУППИРОВКУ В ЗАДАННОМ ПОЛОЖЕНИИ УГЛЕВОДОФОСФАТНОГО ОСТОВА

А.С. Романенков, О.А. Борисова, Е.А. Кубарева, Т.С. Орецкая, В.Г. Метелев

(кафедра химии природных соединений, e-mail: roma_andr@mail.ru)

Оптимизирован синтез олигодезоксирибонуклеотидов с межнуклеотидной фосфорилдисульфидной группировкой. Понижение pH реакционной смеси до 4,5–5,0 позволило существенно сократить время реакции и повысить выход целевых соединений. Установлено, что модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды легко вступают в реакцию дисульфидного обмена с тиоловыми группами дитиотрепта и цистеина, но не взаимодействуют с лизином.

Олигонуклеотиды с химически активными группировками, направленно введенными в углеводофосфатный остов, нашли широкое применение при изучении механизмов действия различных белков и ферментов нуклеинового обмена [1, 2]. Такие ДНК-реагенты, способные образовать ковалентную связь с определенными аминокислотными остатками ДНК-узнающих белков, позволяют установить пространственную сближенность отдельных аминокислотных остатков с соответствующими нуклеотидными звеньями ДНК. Кроме того, селективные ДНК-реагенты могут служить основой для создания высокоспецифических ингибиторов отдельных ферментов.

Недавно в нашей лаборатории были предложены новые химически активные производные ДНК [3], содержащие единичные фосфорилдисульфидные группировки (ФДГ*) $[-O-P(-O^-)(=O)-SS-CH_2-]$ вместо природных фосфодизфирных $[-O-P(-O^-)(=O)-O-CH_2-]$.

Особенностью введенной межнуклеотидной дисульфидной группировки является ее способность участвовать в тиол-дисульфидном обмене с тиолсодержащими соединениями, что, в частности, позволяет ковалентно связать ДНК-узнающие белки, содержащие цистеин, с модифицированными олигонуклеотидами. Протекание реакции возможно при образовании специфического ДНК-белкового комплекса в водных буферных растворах при физиологических значениях pH.

Целью настоящей работы являлись разработка оптимальных методов синтеза и изучение свойств

ФДГ-содержащих олигонуклеотидов в реакциях с различными низкомолекулярными нуклеофилами. Полученные данные позволяют расширить возможности использования таких аналогов ДНК для изучения структуры цистеин-содержащих белков и их комплексов с нуклеиновыми кислотами.

Экспериментальная часть

Буферные растворы. А: 50 мМ морфолиноэтансульфокислота (pH 7,0), 20 мМ $MgCl_2$; Б: 0,015 М цитрат натрия (pH 4,5–7,8), 0,15 М NaCl, 0,02 М $MgCl_2$; В: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 0,3 М NaCl, 1 мМ ЭДТА; ТБЕ: 50 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 50 мМ H_3BO_3 , 1 мМ ЭДТА.

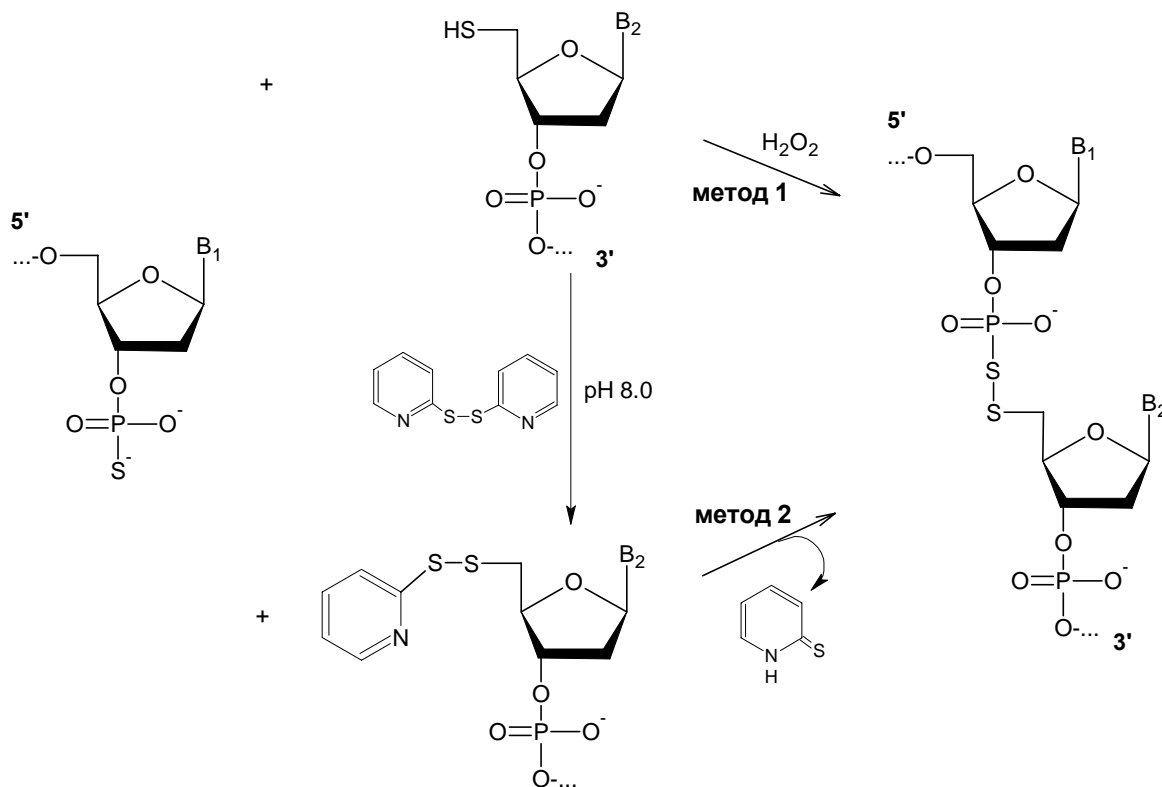
Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие 3'-тиофосфатную или 5'-триметилмеркаптогруппировку, были синтезированы амидофосфитным методом на синтезаторе *Applied Biosystems 380B* (США) по методикам, опубликованным ранее [4–6].

УФ-спектры поглощения водных растворов олигонуклеотидов регистрировали на двулучевом спектрофотометре *Hitachi 150-20* (Япония).

Масс-спектры регистрировали на приборе "*Voyager DEVISION 2000*" (*PE Biosystems*).

Электрофорез олигонуклеотидов в денатурирующих условиях проводили в плоском ПААГ (20%-й акриламид, 1%-й N,N' -метиленабисакриламид, 7 М мочевины) в ТБЕ буфере при напряжении 1200 В. Реакционные смеси олигонуклеотидов наносили на гель в 5 мкл 80%-го водного раствора формамида. Положение олигонуклеотидных фрагментов определя-

*Принятые сокращения: ДТТ – дитиотрепт, ДМФА – диметилформамид, ПААГ – полиакриламидный гель, Трис-2-амино-2-(гидрокси-метил)-1,3-пропандиол, ФДГ – фосфорилдисульфидная группировка. ЭДТА – динатриевая соль этилендиэтилтетрауксусной кислоты. При обозначении олигодезоксирибонуклеотидов индекс d опущен.



B₁ – A, C, T или G, B₂ – C или T

ли визуально при УФ-облучении. Гель фотографировали камерой МР-4 (“Polaroid”, США). Для выделения олигонуклеотидов из геля использовали буфер В.

Восстановление димеров 3'-тиофосфорилированных олигонуклеотидов. К 15 нмоль олигонуклеотида в 100 мкл воды добавляли 25 мкл 0,05 М Трис-НСl (рН 7,5), 25 мкл 0,1 М ДТТ. Полученный раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 40–50 мин, олигонуклеотид осаждали 600 мкл 2%-го раствора LiClO₄ в ацетоне с последующим центрифугированием.

Удаление тритильной группы с 5'-дезоксид-5'-триметилмеркаптопроизводных олигонуклеотидов. К 3–5 ОЕ₂₆₀ 5'-триметилмеркаптоолигонуклеотида в 100 мкл воды добавляли 6 мкл 0,15 М нитрата серебра. Полученный раствор выдерживали при комнатной температуре 1 ч, добавляли 30 мкл 0,1 М ДТТ, перемешивали, выдерживали 5 мин и центрифугировали. Осадок дважды промывали водой. Из объединенных растворов олигонуклеотид осаждали спиртом или раствором перхлората лития в ацетоне.

5'-Дезокси-5'-(пирид-2-илдитио)олигонуклеотиды получали обработкой соответствующих меркаптосоединений 0,03 М 2,2'-дипиридилдисульфидом в буфере 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), содержащем 50% ДМФА, при 25° в течение 3 ч. Затем добавляли ацетат натрия до концентрации 0,3 М, олигонуклеотиды осаждали добавлением 4–5-кратных объемов этилового спирта. Выход продукта реакции составлял 90–95%.

Синтез олигонуклеотидов с ФДГ

Химическое лигирование в присутствии перекиси водорода (метод 1). 3 нмоль олигонуклеотид-3'-тиофосфосфата, 3 нмоль 5'-дезоксид-5'-меркаптоолигонуклеотида и 3 нмоль комплементарной матрицы растворяли в 40 мкл буфера А, содержащего 70 мМ Н₂О₂. Реакционную смесь инкубировали при 0° в течение 1 ч. Олигонуклеотиды осаждали 5-кратным избытком 2% раствора LiClO₄ в ацетоне и анализировали в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Химическое аутолигирование (метод 2). 3 нмоль олигонуклеотид-3'-тиофосфосфата и 2,7 нмоль

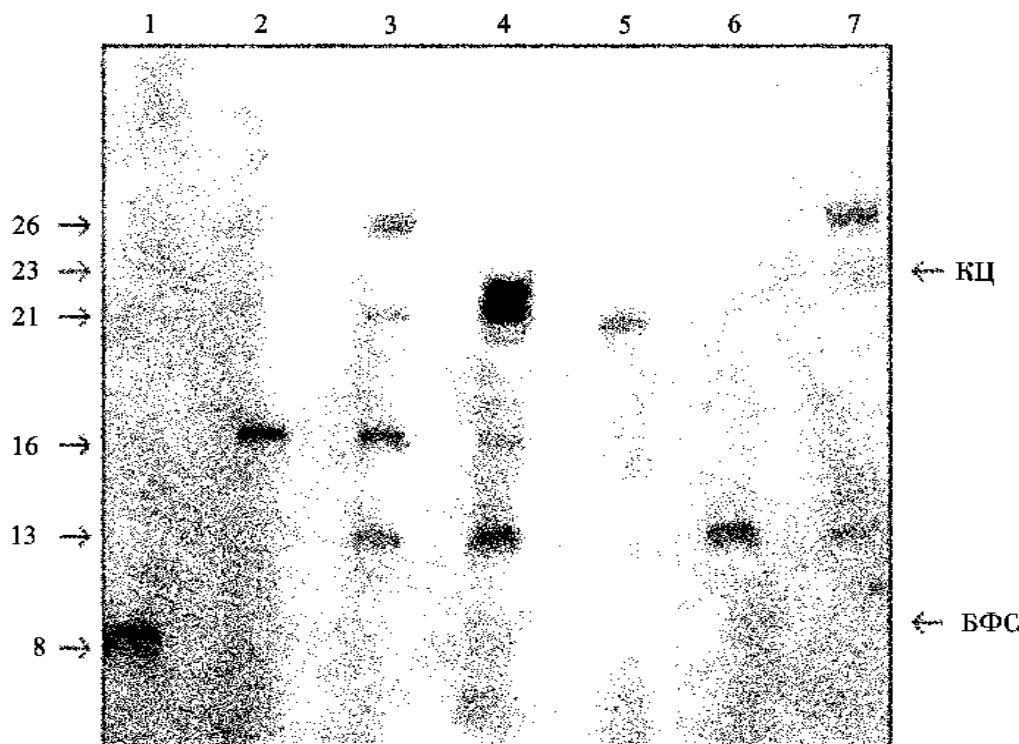


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов лигирования при синтезе олигонуклеотида П. Исходный 3'-тиофосфорилированный олигонуклеотид (дорожка 6), он же в смеси с гомодимером с 3'-3' дифосфорилдисульфидной связью (дорожка 7); исходный 5'-дезоксид-5'-меркаптоолигонуклеотид (дорожка 1), он же в смеси с гомодимером с 5'-5' дисульфидной связью (дорожка 2). Продукты лигирования 3'-тиофосфорилированного и 5'-дезоксид-5'-меркапто-компонента под действием 70 мМ H_2O_2 в буфере А в отсутствие (дорожка 3) и в присутствии (дорожка 4) 23-звенной комплементарной матрицы TGCAGTCAATAGCCAGGAACGTC. Контрольный немодифицированный 21-звенный олигонуклеотид (дорожка 5). Стрелками указано положение 8–26-звенных олигонуклеотидов, а также красителей бромфенолового синего (БФС) и ксиленианола (КЦ)

5'-дезоксид-5'-(пирид-2-илдитио)олигонуклеотида растворяли в 30 мкл буфера Б (рН 4,5). Полученную реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Олигонуклеотиды выделяли и анализировали, как в методе 1.

Реакции олигонуклеотидов, содержащих ФДГ, с низкомолекулярными нуклеофилами. 1,5 нмоль водного раствора ФДГ-содержащего олигонуклеотида инкубировали с ДТТ, цианидом калия, азидом натрия, водным раствором аммиака или аминокислотами (N^α -ацетил-L-лизином, L-цистеином). Значения рН и времени инкубации реакционных смесей указаны в таблице. Олигонуклеотиды осаждали 5-кратным избытком 2%-го раствора $LiClO_4$ в ацетоне и анализировали в 20%-м ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Результаты и обсуждение

Для направленного введения фосфорилдисульфидной группировки в состав углеводофосфатного остова ДНК были использованы два различных метода (схема 1).

Метод 1 был предложен ранее [7] для получения олигонуклеотидов, содержащих дифосфорилдисульфидные группировки $[-O-P(O)(O^-)-SS-P(O)(O^-)-O-]$. В настоящей работе он был применен для получения олигонуклеотидов с ФДГ. Суть этого метода заключается в химическом лигировании 3'-тиофосфорилированного и 5'-дезоксид-5'-меркаптопроизводного составляющих компонентов олигонуклеотидной цепи под действием перекиси водорода, которая окисляет сульфгидрильные группы олигонуклеотидов с образованием дисульфидной связи (схема 1).

Основой метода 2 является тиофосфорил-дисульфидный обмен между тиофосфосфатом одного компонента и (пирид-2-ил)дисульфидной группировкой второго (схема 1). Этот метод уже был использован для введения ФДГ в состав олигонуклеотидов, однако 85–95%-й выход продукта реакции наблюдался лишь после 16-часовой инкубации реакционной смеси в буфере с рН 7,0 [3]. В данной работе были оптимизированы условия образования ФДГ на примере синтеза следующих олигонуклеотидов:

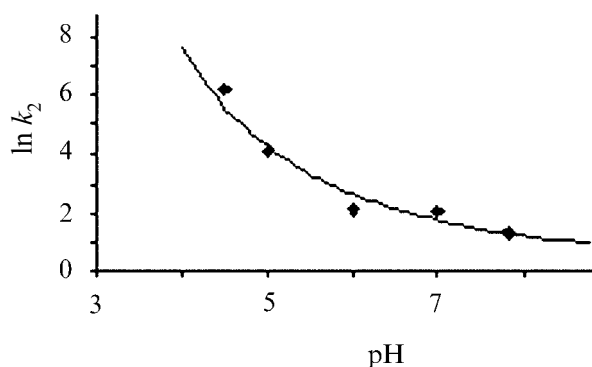


Рис. 2. Зависимость натурального логарифма константы скорости реакции ($\ln k_2$) образования ФДГ в составе олигонуклеотида III от pH

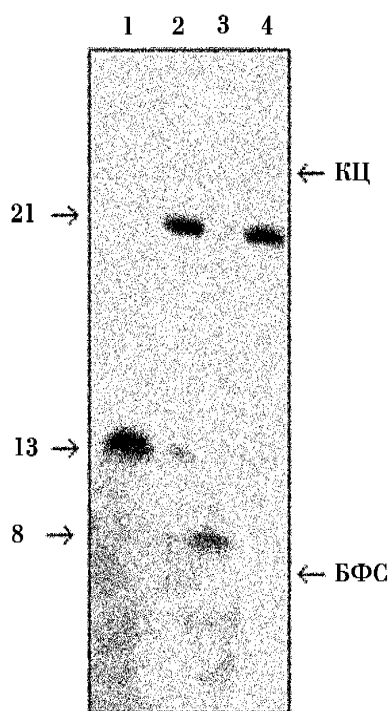


Рис. 3. Электрофоретический анализ реакционной смеси, полученной при синтезе олигонуклеотида II (дорожка 2). Исходные олигонуклеотид-3'-тиофосфат (дорожка 1) и 5'-дезоксид-5'-(пирид-2-илдитио)олигонуклеотид (дорожка 3), контрольный немодифицированный 21-звенный олигонуклеотид (дорожка 4). Стрелками указано положение олигонуклеотидов и красителей БФС и КЦ

ACCTCGGAAAGTpssCCCCTCT, I
 ACGTTCCTGGCTApssTTGACTGC, II
 TCGGTTCPssCTGGCTCT, III
 pss – фосфорилдисульфидная группировка.

Лигирование по методу 1 позволило получить продукты реакции, содержащие ФДГ, с выходами 5–10% (рис. 1, дорожка 3). В присутствии матрицы, комплементарной тиофосфатному и меркапто-компо-

нентам, выход олигонуклеотидов с ФДГ повышался до 80–85% при инкубации реакционной смеси в течение 1 ч (рис. 1, дорожка 4).

Лигирование по методу 2 требовало активации тиоловой группы в составе 5'-дезоксид-5'-меркапто-компонента 2,2'-дипиридилдисульфидом (схема 1).

Пиридилдисульфидные производные олигонуклеотидов стабильны при хранении (-10°) в течение 2–3 недель.

Одним из продуктов реакции образования ФДГ по методу 2 является 2-тиопиридон (схема 1), который имеет максимум поглощения при 343 нм ($\epsilon_{343} = 7060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), т. е. в той области спектра, где не поглощают пуриновые и пиримидиновые основания. Следовательно, за кинетикой реакции можно следить спектрофотометрически по количеству выделенного 2-тиопиридона. Этот подход успешно применялся в [8] и был использован в данной работе для определения константы скорости реакции образования ФДГ по методу 2 в составе олигонуклеотида III (k_2) в зависимости от pH среды. Реакцию проводили в буфере Б с разными значениями pH (4,5; 5,0; 6,0; 7,0; 7,8) при использовании небольшого избытка 3'-тиофосфорированного компонента олигонуклеотида III по отношению к 5'-дезоксид-5'-(пирид-2-илдитио)олигонуклеотиду (1,2:1,0). В результате исследования была получена зависимость $\ln k_2$ от pH реакционной смеси (рис. 2).

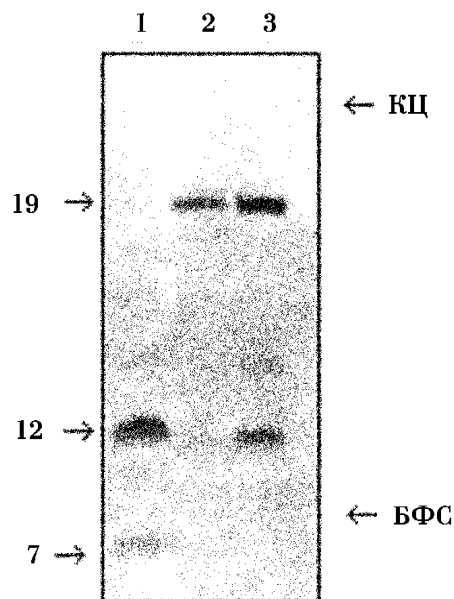
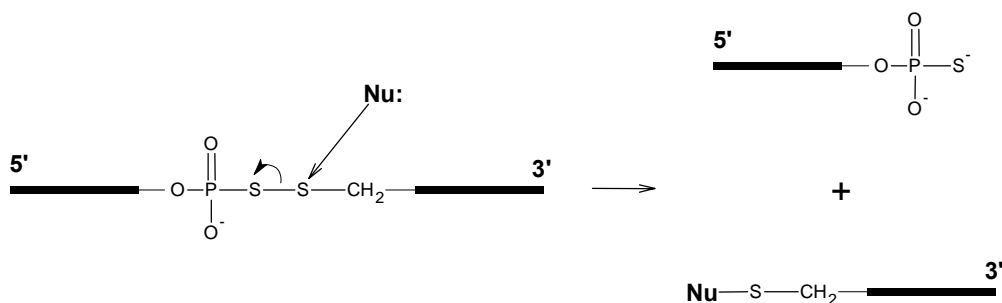


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов реакции олигонуклеотида I с 50 мМ раствором ДТТ (дорожка 1) и с 500 мМ раствором азиды натрия NaN_3 (дорожка 3). Исходный олигонуклеотид I (дорожка 2). Стрелками указано положение олигонуклеотидов и красителей БФС и КЦ

Результаты расщепления ФДГ в составе олигонуклеотида под действием различных низкомолекулярных нуклеофилов

Нуклеофил	Концентрация нуклеофила в реакционной смеси	pH реакционной смеси	Время реакции, ч	% расщепления ФДГ
SH-группа ДТТ	0,05 М	7,5	1	100
CN ⁻	0,25 М	8–10	1	100
N ₃ ⁻	0,5 М	7,5	1	~30
NH ₃	2,5 М	11	1	~50
ε-NH ₂ -группа лизина	8 мМ	7,5	5	~3
SH-группа цистеина	8 мМ	7,5	1	100

Схема 2



Проведенные исследования показали, что с уменьшением pH скорость реакции образования ФДГ возрастает. При pH 4,5 и 25° через 30 мин выходы олигонуклеотидов I–III составляли 95–98% (рис. 3). Исходя из значений констант диссоциации функциональных групп, участвующих в образовании ФДГ [8], можно полагать, что реакция осуществляется за счет атаки моноаниона тиофосфорилированного компонента на моноанион 2-пиридилдисульфидного производного олигонуклеотида. Протонирование атома азота пиридинового цикла увеличивает электрофильность атома серы в составе дисульфида и делает протонированный 2-тиопиридон хорошей уходящей группой.

Строение полученных по методу 2 модифицированных олигонуклеотидов было подтверждено данными масс-спектрометрии: для олигонуклеотида I –

M⁺ 5756,8/5763,87, а для олигонуклеотида II – M⁺ 6436,3/6436,5.

Таким образом, было установлено, что для быстрого и эффективного введения ФДГ в состав олигонуклеотидов по методу 2 рационально использовать буферный раствор с pH 4,5. Использование метода 1 также оправдано, так как позволяет сразу получать ФДГ-содержащие олигонуклеотидные дуплексы с достаточно высоким выходом (80–85%) без предварительной активации 5'-дезоксид-5'-меркаптокомпонента модифицируемой олигонуклеотидной цепи.

Введение ФДГ в состав олигонуклеотида приводит к появлению дополнительного электрофильного центра [3]. Нуклеофильной атаке подвергается атом серы, связанный с метиленовой группой 5'-компонен-

та олигонуклеотидной цепи (схема 2). В этом случае уходящей группой будет являться более сильная 3'-тиоалкилфосфорная кислота.

В данной работе была изучена устойчивость олигонуклеотидов, содержащих ФДГ, к действию таких низкомолекулярных нуклеофилов, как ионы CN^- и N_3^- , аммиак, а также аминокислоты N^α -ацетил-L-лизина и тиолят-аниона ДТТ и L-цистеина [9]. Все проведенные реакции сопровождались расщеплением ФДГ, однако процент расщепления был различен для разных нуклеофилов. Полученные результаты представлены в таблице.

Работа выполнена при поддержке грантов "Университеты России" (№УР 03.05.010) и РФФИ (№ 01-04-48605).

Как и следовало ожидать, ФДГ в составе олигонуклеотида количественно расщеплялась раствором 50 мМ ДТТ, т. е. проявляла свойства дисульфид-содержащей группы (рис. 4, дорожка 1) [10], а под действием 0,5 М азида натрия расщепление ФДГ составило лишь 30% (рис. 4, дорожка 3). Полученные данные по расщеплению ФДГ под действием нуклеофильных групп аминокислот лизина и цистеина (таблица) позволяют предположить, что ФДГ в составе ДНК-белкового комплекса будет преимущественно взаимодействовать с остатками цистеина белка, но не с ϵ -аминогруппой лизина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozlov I.A., Kubareva E.A., Ivanovskaya M.G., Shabarova Z.A. // *Antisense Nucleic Acid Drug. Dev.* 1997. **7**. P.279.
2. Purmal A.A., Shabarova Z.A., Gumpert R.I. // *Nucleic Acids Res.* 1992. **20**. P. 3713.
3. Metelev V.G., Borisova O.A., Volkov E.M. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2001. **29**. P. 4062.
4. Метелев В.Г., Орецкая Т.С. // *Биоорганич. химия.* 1999. **25**. P. 490.
5. Burgin A.B.Jr., Huizenga B.N., Nash H.A. // *Nucleic Acids Res.* 1995. **23**. P. 2973.
6. Sproat B.S., Beijer B., Rider P., Neuner P. // *Nucleic Acids Res.* 1987. **15**. P. 4837.
7. Dolinnaya N.G., Metelev V.G., Oretskaya T.S. et al. // *FEBS Lett.* 1999. **444**. P. 285.
8. Wu C.-W., Eder P.S., Gopalan V. and Behrman E.J. // *Bioconjug. Chem.* 2001. **12**. P. 842.
9. Хаскин Б.А. // *Усп. хим.* 1994. **53**. С. 1325.
10. Packer L. // *Methods Enzymol.* 1995. **251**. P.361

Поступила в редакцию 24.12.02

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES CONTAINING PHOSPHORYLDISULFIDE MOIETY IN THE PREDETERMINED POSITION OF CARBOHYDRATE-PHOSPHATE BACKBONE

A.S. Romanenkov, O.A. Borisova, E.A. Kubareva, T.S. Oretskaya, V.G. Metelev

(Division of Chemistry of Natural Compounds; e-mail: roma_andr@mail.ru)

The synthesis of oligodeoxyribonucleotides with internucleotide phosphoryldithio group was optimized. The lowering of incubation mixture pH to 4.5 – 5.0 allowed to lessen substantively the reaction time and to increase the yield of target compounds. It was demonstrated that modified oligodeoxyribonucleotides are able to interact easily with mercapto groups of dithiotreitol and cysteine via thiol-disulfide exchange, but they are stable to lysine treatment.