



УДК 577.113.4

КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК С ПОМОЩЬЮ [Fe·EDTA]-ПРОИЗВОДНОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА

*Бросалина Е. Б., Власов В. В., Казаков С. А.**

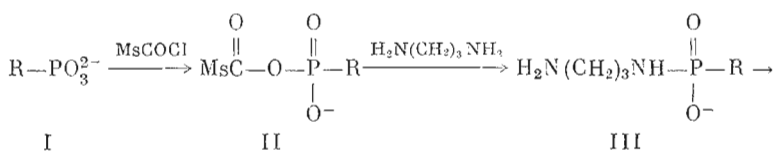
*Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Производные олигонуклеотидов являются перспективными реагентами для селективного повреждения нуклеиновых кислот и белков, образующих с ними специфические комплексы [1—4]. Вместе с тем в опытах по подавлению трансляции олигонуклеотидными производными [2—5] и немодифицируемыми олигонуклеотидами [6—10], комплементарными избранным мРНК, была показана примерно одинаковая их эффективность, зависящая в основном от концентрации олигонуклеотидов и стабильности образующихся дуплексов. Дальнейший прогресс в этой области связан, в частности, с поиском более эффективных присоединяемых к олигонуклеотидным «адресам» повреждающих группировок, использование которых позволило бы существенно снизить концентрации олигонуклеотидов, необходимые для подавления матричной функции нуклеиновых кислот.

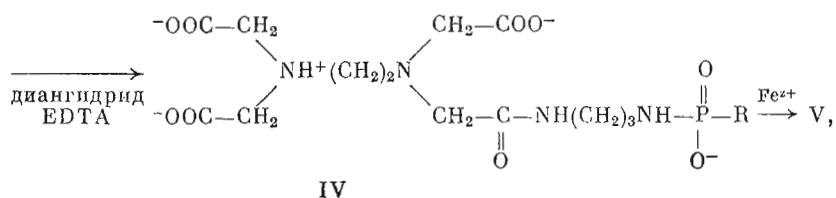
Ранее мы впервые использовали в качестве комплементарно адресованного реагента [Fe·EDTA]-производное олигонуклеотида [11]. Позднее аналогичные работы были выполнены за рубежом [12—14]. Показано, что олигонуклеотиды, несущие каталитически активную [Fe·EDTA]-группировку, способны расщеплять нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) вблизи участка комплементарного связывания в присутствии ионов Fe^{2+} , H_2O_2 (или O_2 воздуха) и дитиотрепта. При этом сами олигонуклеотидные производные также подвергались интенсивной деградации, что существенно ограничивало эффективность их действия.

В настоящей работе показано, что в условиях недостатка O_2 в присутствии аскорбиновой кислоты [Fe·EDTA]-производное олигонуклеотида способно сайт-специфически модифицировать одноцепочечную ДНК (без ковалентного присоединения к ней) при незначительной степени ее прямого расщепления. В этих условиях практически не наблюдается саморасщепления олигонуклеотидного реагента. Это открывает принципиальную возможность повреждения нескольких молекул целевой нуклеиновой кислоты одной молекулой такого реагента.

Получение [Fe·EDTA]-производного олигонуклеотида проводили без выделения промежуточных продуктов по следующей схеме:



* Запросы посылать С. А. Казакову.



IV

где $\text{R—PO}_3^{2-} = d(^{32}\text{P}^{\text{T}}\text{GACCCTCTCCS})\text{A}$; MsCOCl — мезитилкарбонилхлорид. Синтез фосфамида (III) описан ранее в работе [15]. Производное (IV) получали по методу [12]. Избыток EDTA отделяли гелехроматографией на колонке с сефадексом G-50, используя в качестве элюента свежеприготовленный $1 \cdot 10^{-5}$ М раствор $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, содержащий 0,1 М NaCl и 0,05 М трис-HCl (pH 7,5). При этом производное (IV) прочно связывалось с ионом железа, образуя комплекс (V). Продукты реакций на всех стадиях анализировали геле-электрофорезом в 20% ПААГ в отсутствие мочевины. Выходы продуктов (II) — (V), дающих на радиоавтографах гелей четкие полосы с достоверно различающимися подвижностями, на каждой стадии составляли 85–90%.

Наша схема в отличие от предложенных ранее в работах [11–14] позволяет проводить все стадии синтеза с высокими выходами в одной микропробирке, используя очень малые количества незащищенных олигонуклеотидов. Впервые было показано, что комплекс $[\text{Fe} \cdot \text{EDTA}]$ — олигонуклеотид кинетически устойчив даже в условиях колоночной хроматографии на хелатирующем сорбенте Chelex-100 (Bio-Rad, США) или геле-электрофореза в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ М EDTA. Выделенный после этих процедур комплекс (V) проявляет реакционную способность. Это позволяет не добавлять в реакционные смеси избыток свободных ионов железа (как это делалось в предыдущих работах [11–14]), увеличивающих количество неспецифических повреждений ДНК.

В качестве мишени для комплементарно адресованной модификации была использована ^{32}P -меченая по 3'-концу одноцепочечная ДНК, содержащая 302 нуклеотидных остатка, которую получали по методу [16]. Модификацию проводили в течение 30 мин при 37° С в частично дегазированных (при пониженном давлении, создаваемом водоструйным насосом) водных растворах, содержащих 0,1 М NaCl и 0,05 М трис-HCl (pH 7,5), а также по 5 мкг poly(A). Реакцию останавливали осаждением ДНК этанолом [17]. Образцы ДНК после модификации анализировали геле-электрофорезом в 10% ПААГ для секвенирования [17]. Основными детектируемыми продуктами модификации оказались щелочлабильные пиримидиновые остатки ДНК вблизи 5'-конца олигонуклеотидного реагента (рис. 1). В то же время прямое расщепление в этом участке ДНК (до обработки пиперидином) оказалось незначительным, а положения этих разрывов — несколько иными, чем «скрытых» разрывов (рис. 1, дорожки 3, 4). Комплекс железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой $[\text{Fe} \cdot \text{EDTA}]$ при аналогичных условиях вызывает лишь незначительное статистическое расщепление ДНК (рис. 2), что согласуется с литературными данными [18] и подтверждает направляющую роль олигонуклеотидного «адреса». Следует отметить, что прямые и «скрытые» разрывы ДНК происходят преимущественно вне дуплекса, образующегося между ней и олигонуклеотидным реагентом (рис. 1). Также с помощью геле-электрофореза было показано, что ^{32}P -меченый олигонуклеотидный реагент в условиях опытов не подвергается деградации.

Наши результаты, полученные в условиях, близких к существующим внутри живой клетки (pH, температура, ограниченное количество O_2 в растворе), хорошо согласуются с литературными данными о продуктах повреждения ДНК под действием активированных форм кислорода, большинство из которых не приводит к прямым разрывам (образуя щелочлабильные, эндонуклеазочувствительные или стабильные продукты модификации) [19–22]. Важно, что скрытые повреждения также способны нарушать матричные свойства нуклеиновых кислот [23]. Кроме того, металл-индуцированные OH-радикалы способны модифицировать молекулы

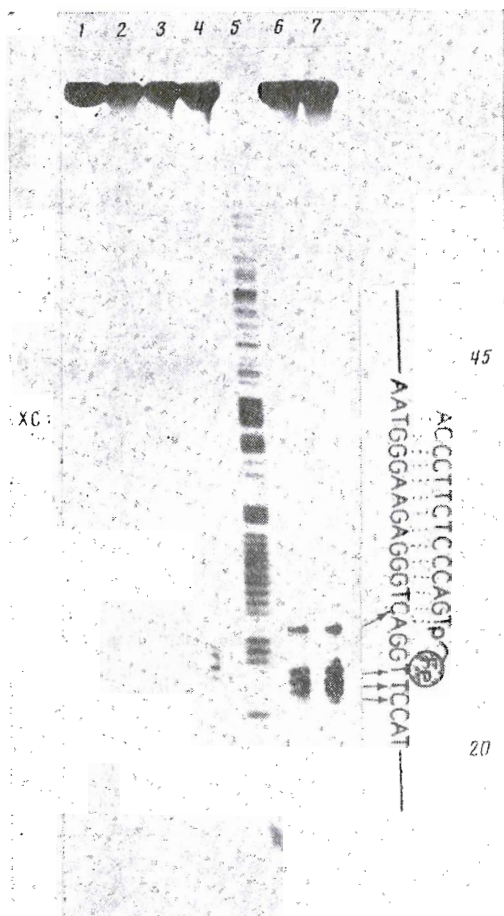


Рис. 1



Рис. 2

Рис. 1. Результаты электрофоретического анализа ^{32}P -меченой одноцепочечной ДНК (1 — контроль) и продуктов ее модификации комплексом (V) ($1,5 \cdot 10^{-7}$ М) в отсутствие (2) и в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М (3, 6) или $5 \cdot 10^{-3}$ М (4, 7) аскорбиновой кислоты до (2–4) и после 30 мин обработки 1 М пиперидином при 90°C (6, 7). Концентрация молекул ДНК составляла $1,5 \cdot 10^{-8}$ М. На дорожке 5 — маркерное частичное расщепление ДНК по пуриновым основаниям [16]. Справа схематично изображен комплементарный комплекс ДНК с олигонуклеотидным реагентом. Цифры соответствуют положению нуклеотидных остатков в первичной структуре ДНК (от 3'-конца)

Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа продуктов расщепления $1,5 \cdot 10^{-8}$ М ^{32}P -меченой одноцепочечной ДНК с помощью $1,5 \cdot 10^{-7}$ М комплексов $[\text{Fe-EDTA}]$ (1, 3) и (V) (2, 4) в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М аскорбиновой кислоты до (1, 2) и после 30 мин обработки 1 М пиперидином при 90°C (3, 4). Условия модификации см. рис. 1. Справа приведена первичная структура ДНК в области ее сайт-специфического расщепления

белков [24–26]. Поэтому можно предположить, что нарушение нормальной экспрессии генетической информации может происходить не только из-за повреждения нуклеиновой кислоты-матрицы, но и за счет модификации полимеразы (например, вирус-специфической) при ее сближении с участком комплементарного связывания реагента данного типа. Это, а также возможность использования в качестве «включателя» $[\text{Fe-EDTA}]$ -группировки аскорбиновой кислоты (см. [27] и рис. 1), которая в отличие от дитиотрепта практически безвредна для организма, позволяет считать $[\text{Fe-EDTA}]$ -производные олигонуклеотидов перспективными для использования *in vivo*.

Авторы благодарят М. А. Подымицогина за предоставление тетрадекануклеотида и С. В. Мамасва за рекомбинантную ДНК.

1. Кнорре Д. Г., Власов В. В. // Вестн. АН СССР. 1983. № 12. С. 74–81.
2. Knorre D. G., Vlassov V. V., Zarytova V. F. // Biochimie. 1985. V. 67. № 7–8. P. 785–789.
3. Hélène C., Montenay-Garestier T., Saison T., Takasugi M., Toulme J. J., Asseline U., Lancelot G., Maurizot J. C., Toulme F., Thuong N. T. // Biochimie. 1985. V. 67. № 7–8. P. 777–783.
4. Miller P. S., Agris C. H., Aurelian L., Blake K. R., Murakami A., Reddy M. P., Spitz S. A., Ts'o P. O. P. // Biochimie. 1985. V. 67. № 7–8. P. 769–776.
5. Власов В. В., Годовиков А. А., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Кугявин И. В. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 275. № 5. С. 1263–1265.
6. Blake K. R., Murakami A., Miller P. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 22. P. 6132–6138.
7. Kawasaki E. S. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 13. P. 4991–5004.
8. Haepule M.-T., Frank R., Dobberstein B. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 3. P. 1427–1448.
9. Galili G., Kawata E., Cuellar R. E., Smith L. D., Larkins B. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 3. P. 1511–1524.
10. Cazenave C., Loreau N., Toulmé J.-J., Hélène C. // Biochimie. 1986. V. 68. № 9. P. 1063–1069.
11. Boulorin A. S., Vlassov V. V., Kazakov S. A., Kutiavin I. V., Podyminogin M. A. // FEBS Lett. 1984. V. 172. № 1. P. 43–46.
12. Chu B. C. F., Orgel L. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 963–967.
13. Dreyer G. B., Dervan P. B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 968–972.
14. Boidot-Forget M., Thuong N. T., Chassignol M., Hélène C. // C. r. Acad. sci. 1986. V. 302 (Sér. II). № 2. P. 75–80.
15. Бросалина Е. Б., Грачев С. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 248–256.
16. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кугявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогин М. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1475–1478.
17. Максам А. М., Гилберт У. // Молекулярн. биология. 1986. Т. 20. Вып. 3. С. 581–636.
18. Tullius T. D., Dombroski B. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 15. P. 5469–5473.
19. Fitchett M., Gilbert B. C., Jeff M. // Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 1985. V. 311. B. № 1152. P. 517–529.
20. Sugiyama H., Xu C., Murugesan M., Hecht S. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. № 13. P. 4104–4105.
21. Kow Y. W., Wallace S. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 24. P. 8354–8358.
22. Helland D. E., Doetsch P. W., Haleltine W. A. // Mol. Cell Biol. 1986. V. 6. № 6. P. 1983–1990.
23. Rouet P., Essigman J. M. // Cancer Res. 1985. V. 45. № 12(4). P. 6113–6118.
24. Gutteridge J. M. C., Wilkins S. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 759. № 1. P. 38–41.
25. Marx G., Chevion M. // Biochem. J. 1985. V. 236. № 2. P. 397–400.
26. Wolf S. P., Dean R. T. // Biochem. J. 1986. V. 234. № 2. P. 399–403.
27. Udenfriend S., Clark C. T., Azelrod J., Brodie B. B. // J. Biol. Chem. 1954. V. 208. № 2. P. 741–750.

Поступило в редакцию
12.III.1987

**COMPLEMENTARY ADDRESSED MODIFICATION
OF SINGLE-STRANDED DNA WITH [Fe-EDTA]-OLIGONUCLEOTIDE
DERIVATIVE**

BROSALINA E. B., VLASSOV V. V., KAZAKOV S. A.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR*

A one-tube synthesis scheme for coupling EDTA residue to the 5'-terminus of unprotected oligonucleotides via propylenediamine linker is described. The EDTA derivative of oligonucleotide d(pTGACCCTCTCC)A forms a kinetically stable complex with Fe²⁺ ion. In the presence of ascorbic acid with O₂ limiting, this complex modifies single-stranded DNA (a 302-mer) in a site-specific way near the target complementary nucleotide sequence. The DNA fragment can be then cleaved predominantly at modified pyrimidine nucleotides (hidden breaks) by hot piperidine treatment, whereas few direct breaks (i. e. without piperidine) occurs at this site. No autocleavage of the [Fe-EDTA]-oligonucleotide derivative is observed under the experiment's conditions.