



УДК 577.113.4/6

## КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА ДНК ЖЕЛЕЗОПОРФИРИНОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА

*Иванова Е. М., Мамаев С. В., Федорова О. С.,  
Фролова Е. И.*

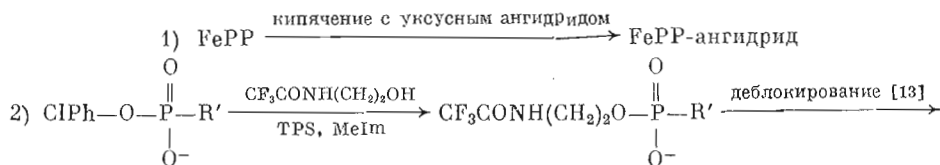
*Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Направленная модификация одноцепочечных нуклеиновых кислот может быть осуществлена с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов, комплементарных к определенным участкам НК (комплементарно-адресованная модификация [1]). Недавно в литературе появились данные о специфической модификации НК производными олигонуклеотидов с металлокомплексами, каталитически активными в реакциях окисления молекулярным кислородом: Fe(III)–EDTA [2–6], Cu(II)–1,10-фенантролин [7] и Fe(II)–метилпирропорфирин XXI [8]. В качестве сопряженного субстрата в работах [2–5, 7, 8] были использованы тиолсодержащие соединения, а в [6] – аскорбиновая кислота. В работах [3, 4, 6, 7] было показано, что расщепление НК происходит в районе места связывания реагента вблизи металлокомплексной группировки. Участок расщепления составляет 14 [3], 16 [4], 7 [6] и 5 [7] нуклеотидов, что обусловлено, вероятно, как диффузией активных кислородных частиц ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и  $OH$ ), образующихся при взаимодействии комплекса металла с  $O_2$  и участвующих в окислительной деструкции полинуклеотидной цепи, так и отсутствием жесткой фиксации металлокомплексной группировки относительно соседней цепи в комплементарном комплексе.

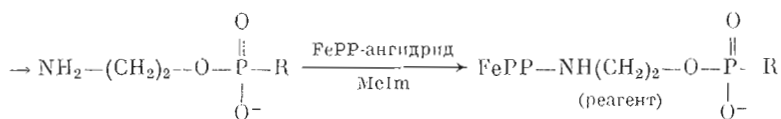
Можно предположить, что металлопорфириновые производные олигонуклеотидов будут приводить к более направленной модификации НК [3], так как, во-первых, металлопорфириновая группировка сама должна участвовать в связывании с НК [9], что будет обеспечивать ее более жесткую фиксацию, во-вторых, активные кислородные частицы, возможно, не будут выходить из координационной сферы металлокомплексов [10]. В работе [8] вопрос о направленности модификации не был изучен, так как мишенью служила poly(dA).

Ранее в работах [11, 12] проводили комплементарно-адресованную модификацию 303-нуклеотидного фрагмента кДНК вируса клещевого энцефалита (структуру фрагмента см. в [11]) с помощью 5'- и 3'-алкилирующих производных олигонуклеотида d(pTGACCCCTCTCCS)гА, комплементарного участку 261–274. В настоящей работе было синтезировано производное данного олигонуклеотида с геминном (комплекс Fe(III) с протопорфирином IX) и проведена модификация фрагмента ДНК.

Синтез реагента проводили по схеме:

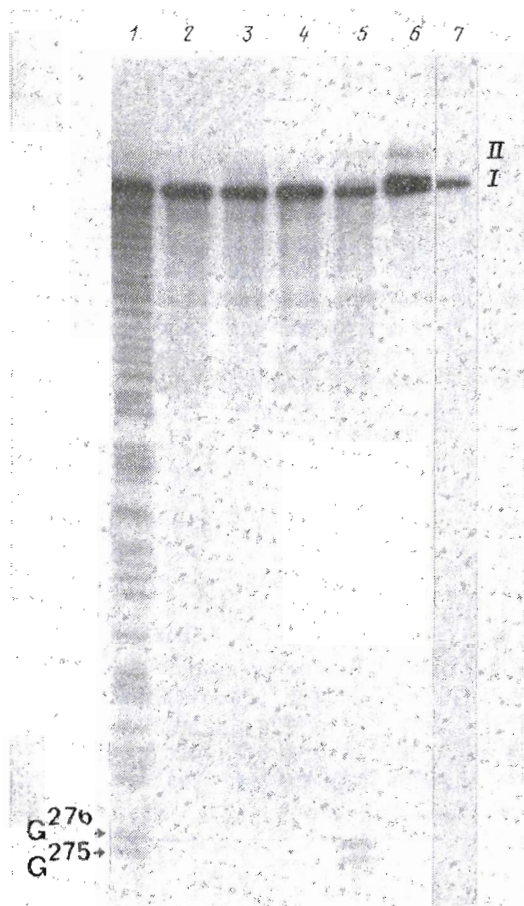


Сокращения: НК – нуклеиновая кислота, FePP – комплекс Fe(III) с протопорфирином IX, TPS – триизопропилбензолсульфохлорид, MeIm – N-метилмидазол, FePP-ангидрид – внутренний ангидрид гемина, R' – защищенный и R-незащищенный олигонуклеотиды, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.



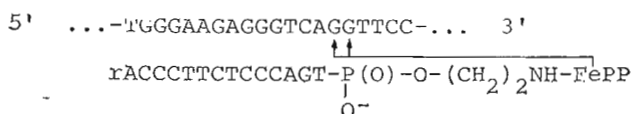
Выход ангидрида гемина на первой стадии синтеза, по данным ТСХ и ИК-спектроскопии, приближался к 100%. На второй стадии получение реагента контролировали с помощью ВЭЖХ и спектров оптического поглощения. Его выход с учетом стадий переосаждения, проводимых в целях очистки, составил ~20%.

В ходе модификации 3'-<sup>32</sup>P-меченый фрагмент ДНК (1·10<sup>-8</sup> М) инкубировали с реагентом (6·10<sup>-6</sup> М) в течение 3 ч при 37° С в буфере 50 мМ трис-НСl, 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, рН 7,5, в присутствии O<sub>2</sub>, равновесная концентрация которого равна 2·10<sup>-4</sup> М, и сопряженного субстрата — аскорбиновой кислоты (1·10<sup>-3</sup> М). Затем полинуклеотидный материал осаждали и промывали спиртом. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 10% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Когда это было необходимо, пробы предварительно обрабатывали пиперидином (95° С, 1,5 ч). На рисунке представлен радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов модификации фрагмента ДНК. Видно (дорожка 6), что в присутствии геминового производного олигонуклеотида и аскорбиновой кислоты образуются продукты, обладающие меньшей электрофоретической



Радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов модификации фрагмента ДНК: I — расщепление по остаткам G [14]; 2 — фрагмент ДНК, инкубированный в реакционном буфере; 3–6 — то же, что и 2, но 3 — в присутствии аскорбиновой кислоты, 4 — в присутствии реагента, 5, 6 — в присутствии аскорбиновой кислоты и реагента; 7 — фрагмент ДНК, инкубированный в реакционном буфере (в 1–5 проводилась обработка пиперидином)

подвижностью, чем исходная ДНК. Вероятно, продукты I и II являются результатом ковалентного связывания реагента с ДНК-мишенью. Обработка пиперидином приводит к их исчезновению и селективному расщеплению фрагмента ДНК по остаткам G<sup>275</sup> и G<sup>276</sup> (см. дорожку 5), расположенным в комплементарном комплексе вблизи геминовой группировки:



Степень модификации, оцененная путем денситометрического сканирования радиоавтографа геля (дорожка 6) на приборе Ultrosan XL, составляет 45 и 6% для продуктов I и II соответственно. Степень модификации практически не менялась при уменьшении концентрации реагента на два порядка. Этот результат согласуется с предположением об аффинном характере процесса модификации и ранее полученными данными [12] о зависимости степени модификации фрагмента ДНК 3'-алкилирующим производным данного олигонуклеотида; константа связывания равна  $3,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

Таким образом, такая реакционноспособная группировка, как гемин, вызывает щелочелabile модификацию ДНК, причем модификация происходит в более узком интервале нуклеотидной цепи, чем в случае производных олигонуклеотидов с Fe(III)-EDTA [3, 4, 6] и Cu(II)-1,10-фенантролин [7]. Интересно, что другие сопряженные субстраты (дитиотреит, глутатион, β-меркаптоэтанол, тиогликолат) также приводят к расщеплению фрагмента ДНК по остаткам G<sup>275</sup> и G<sup>276</sup>, но с меньшей эффективностью, чем в случае аскорбиновой кислоты. Геминная группировка реагента в условиях реакции почти не подвергается автодеструкции, как это следует из изучения спектров оптического поглощения гемина, тогда как в работе [8] наблюдали быстрое разрушение комплекса Fe(III)-метилпирропорфрин XXI.

Полученные данные позволяют надеяться, что производные олигонуклеотидов с металлпорфиринами окажутся перспективными реагентами для комплементарно-адресованной модификации НК. Возможно, что наличие в реагенте каталитически активной группировки позволит повысить эффективность модификации по сравнению с алкилирующими производными олигонуклеотидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. // Tetrahedron Lett. 1967. V. 8. № 37. P. 3557-3562.
2. Boutorin A. S., Vlassov V. V., Kazakov S. A., Kutiavin I. V., Podymogin M. A. // FEBS Lett. 1984. V. 172. № 1. P. 43-46.
3. Chu B. C. F., Orgel L. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 963-967.
4. Dreyer G. B., Dervan P. B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 968-972.
5. Boidot-Forget M., Thuong N. T., Chassignol M., Hélène C. // C. r. Acad. sci. 1986. V. 302. Sér. II. № 2. P. 75-80.
6. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Казаков С. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 125-128.
7. Chen C. B., Sigman D. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 19. P. 7147-7151.
8. LeDoan T., Perrouault L., Helene C., Chassignol M., Thuong N. T. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6736-6739.
9. Ward B., Scorobogaly A., Dabrowiak J. C. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6875-6883.
10. Welborn C. H., Dolphin D., James B. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 10. P. 2869-2871.
11. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыжиногин М. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240-247.
12. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221-1229.

13. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 815–820.

14. Maxam A. M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 490–560.

Поступило в редакцию  
21.VIII.1987

**COMPLEMENTARY ADDRESSED MODIFICATION  
OF A SINGLE-STRANDED DNA FRAGMENT BY IRON-PORPHYRIN  
DERIVATIVE OF AN OLIGONUCLEOTIDE**

IVANOVA E. M., МАМАЕВ S. V., FEDOROVA O. S., FROLOVA E. I.

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

Hemin was attached covalently to the 5'-terminus of the 14-mer d(pTGACCCTCTT·CCC)rA and was shown, in the presence of oxygen and a reducing agent, to be active in the cleavage of the complementary sequence (position 261–274) in a 303 nucleotide-long DNA fragment. The yield of the cleavage products reached approximately 50%, the cleavage locus comprising two bases (G<sup>275</sup> and G<sup>276</sup>).