



УДК 577.113.4

© 1990 г.

*Н. В. Амирханов, В. Ф. Зарытова, А. С. Левина***РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ,
СОДЕРЖАЩИХ МЕТИЛФОСФОНАТНЫЕ ГРУППЫ****VI *. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАПРАВЛЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
НА НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ
МЕТИЛФОСФОНАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
В ПРИСУТСТВИИ ЭФФЕКТОРОВ — 3',5'-БИС-N-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)
ФЕНАЗИННОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ***Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Продемонстрирована возможность стабилизации комплементарных комплексов, образованных как R_p -, так и S_p -изомерами метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов (МФАО) с ДНК-матрицей, в присутствии непосредственно примыкающего к одному из концов МФАО 3',5'-бис-N-(2-гидроксиэтил)феназинного производного олигонуклеотида (эффектора), комплементарного соседнему участку ДНК-матрицы. Установлено, что температура плавления дуплекса, образованного ДНК-матрицей $C_5A_8ACAATG$, метилфосфонатными аналогами октатимидилата $Tr(TrTr)_3TrSCH_3$ (R_p - или S_p -изомеры) (где p — метилфосфонатный остаток) и эффектора $PhNH(CH_2)_2NHpCATGTrNH(CH_2)_2NHPh$, на 7—13° С выше, чем температура плавления дуплекса в отсутствие эффектора. Выявлено, что такое повышение стабильности комплекса обеспечивает значительное увеличение предельной степени модификации ДНК-мишени при ее сайт-направленном алкилировании (например, при 40° С для алкилирующего реагента на основе R_p -изомера $Tr(TrTr)_3TrNHCH_2C_6H_4N \cdot (CH_2CH_2Cl)(CH_3)$ в 5—6 раз). На примере октатимидилатных реагентов показано, что позиционная направленность алкилирования ДНК-мишени алкилирующими производными МФАО в присутствии эффектора практически не отличается от позиционной направленности алкилирования реагентами на основе олигонуклеотидов с природными фосфодиэфирными межнуклеотидными связями.

Известно, что метилфосфонатные аналоги олигонуклеотидов (МФАО) устойчивы к действию нуклеаз и лучше, чем природные олигонуклеотиды, проникают через клеточные мембраны [2—5]. Эти привлекательные свойства МФАО открывают перспективу их использования для направленного подавления экспрессии генов [6—11]. Одним из серьезных препятствий к их широкому использованию является то, что они образуют комплементарные комплексы пониженной стабильности. Это обусловлено тем, что при синтезе каждый метилфосфонатный фрагмент образуется в виде смеси двух диастереомеров с R_p - или S_p -конфигурацией, причем последний практически не способен участвовать в комплементарном спаривании [3, 12]. Стандартный прием повышения стабильности комплексов за счет увеличения длины олигонуклеотида в данном случае не может привести к такому же эффекту, как в случае нормальных, природных фосфодиэфирных олигонуклеотидов, поскольку с увеличением числа метилфосфонатных фрагментов возрастает число изомеров, в том числе с неблагоприятной для комплексообразования конфигурацией.

* Сообщение V см. [1]. Сокращения: НК — нуклеиновая кислота, МФАО — метилфосфонатные аналоги олигонуклеотидов, Ph — остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, CH_2RCl — 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензил, p — метилфосфонатный остаток в нуклеотидах. Римские цифры со значком «а» и «б» соответствуют производным индивидуальных диастереомеров МФАО, имеющих абсолютные конфигурации заместителей R_p и S_p при метилфосфонатном атоме фосфора; римские цифры с буквой «в» соответствуют фосфодиэфирным производным октатимидилата. В работе использованы олигонуклеотиды только дезоксирибы — префикс «d» перед названием олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

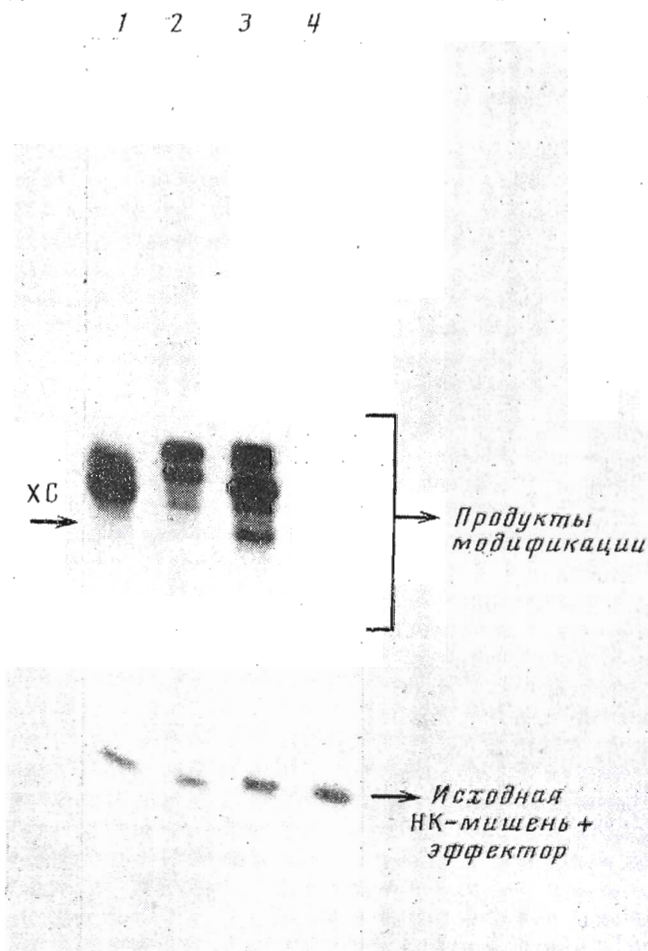


Рис. 2. Электрофореграмма (20% ПААГ, содержащий 7 М мочевины) продуктов алкилирования (20 сут, 8° С). 5'-³²P-меченого олигонуклеотида (V) в присутствии эффектора (III) реагентами (VIa—в) (дорожки 1—3 соответственно). Дорожка 4 — исходный олигонуклеотид (V)

ответственно) и реагентами на основе фосфодиэфирного октатимидилата (VIв). Реакционную смесь подвергали электрофорезу в 20% ПААГ (рис. 2) и определяли предельную степень модификации ДНК-мишени.

Значения $T_{пл}$ и $\Delta T_{пл}$ комплементарных комплексов, образованных с участием (комплексы А) и без участия (комплексы Б*) эффектора (III) в 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,01 М трис-НСl (рН 7,4) Концентрация олигонуклеотидов $1 \cdot 10^{-5}$ М

Комплекс	Состав комплекса*	Конфигурация метилфосфоратного фрагмента в октатимидилатах	Эффектор	$T_{пл}^{**}$ °С ($\pm 0,5^\circ$)	$\Delta T_{пл}$, °С
A1	(I)+(III)+(IIa)	R _D	(+)	33	Δ13
B1	(IV)+(IIa)	»	(-)	20	
A2	(I)+(III)+(IIб)	S _D	(+)	10; 44	Δ>7
B2	(IV)+(IIб)	»	(-)	<3	
A3	(I)+(III)+(IIв)	Фосфодиэфир	(+)	28; 43 (илечо)	Δ13
B3	(IV)+(IIв)	»	(-)	15	
	(I)+(III) (матрица+эффектор)	»	(+)	44	

* $T_{пл}$ комплексов B1—B3, образованных без участия эффектора, определена ранее [47] в условиях, идентичных приведенным в настоящей работе. В качестве матрицы в данном случае был использован олигонуклеотид C₁₂A₂C₂ (IV).

** Для значения $T_{пл}$ означают два максимума на дифференциальной кривой плавления (см. рис. 1).

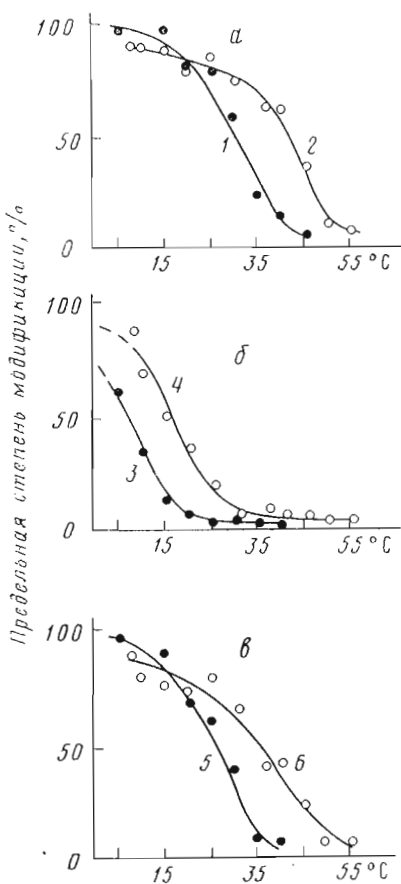


Рис. 3

Рис. 3. Температурные зависимости предельной степени модификации ДНК-мишени $pC_5A_8C_5$ (VII) в отсутствие эффектора (1, 3, 5) и ДНК-мишени $pC_5A_8ACAATG$ (V) в присутствии эффектора (III) (2, 4, 6): а — реагентом (VIa) (R_p -изомер), б — реагентом (VIб) (S_p -изомер), в — реагентом (VIв) (фосфодиэфир)

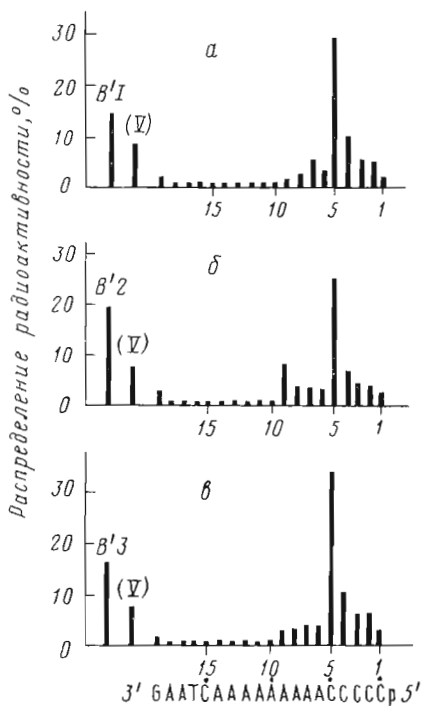


Рис. 4

Рис. 4. Гистограммы электрофореграмм продуктов расщепления $5'$ - ^{32}P -меченого олигонуклеотида (V) по модифицированным основаниям в присутствии эффектора при его алкилировании октаимидилатными реагентами (VIa—в) в присутствии эффектора (III) в условиях образования комплексов B1, B2, B3 (а—в соответственно). (Расщепление олигонуклеотида (V) по модифицированным основаниям проводили последовательной обработкой модифицированного олигонуклеотида гидразингидратом и пиперидином, см. текст.) Числа на оси абсцисс обозначают номер основания с $5'$ -конца олигонуклеотида. B'1—B'3 — продукты модификации, не подвергающиеся расщеплению

На рис. 3 приведены кривые зависимости предельной степени модификации ДНК-мишени (V) всеми исследованными реагентами (кривые 2, 4, 6) от температуры в присутствии эффектора. Для сравнения здесь же приведены кривые модификации ДНК-мишени $pC_5A_8C_5$ (VII) теми же реагентами (VIa—в) в отсутствие эффектора (рис. 3, 1, 3, 5), полученные ранее в работе [18].

Как видно из рисунка, эффектор повышает предельную степень модификации ДНК-мишени в широком диапазоне температур для диастереомеров R_p и S_p (рис. 3а, б), а также реагентов на основе природных фосфодиэфиров (рис. 3в). Например, при $40^\circ C$ в случае реагента на основе R_p -изомера предельная степень модификации мишени возрастает в 5—6 раз (рис. 3а, кривая 2) по сравнению с системой, где эффектор отсутствует (рис. 3а, кривая 1). Существенное различие наблюдается и для реагента на основе S_p -изомера, однако этот эффект проявляется при более низких температурах ($\sim 15^\circ C$) (рис. 3б).

На примере комплексов В1—В3 (схема 2) была рассмотрена позиционная направленность алкилирования ДНК-мишени в присутствии эффектора реагентами на основе МФАО (комплексы В1, В2) и фосфодиэфирного октатимидилата (комплекс В3).

На рис. 4а—в приведены гистограммы продуктов расщепления ДНК-мишени (V) по алкилированным основаниям при модификации мишени в исследуемых комплексах В1—В3. (Расщепление ДНК-мишени по алкилированным основаниям проводили последовательной обработкой модифицированной мишени гидразингидратом и пиперидином). Из этих рисунков видно, что при модификации ДНК-мишени как производными метилфосфонатных аналогов октатимидилата (рис. 4а, б), так и производными фосфодиэфирного октатимидилата (рис. 4в) алкилированию подвергаются основания мишени, расположенные вблизи реакционноспособной группировки (см. комплексы В1—В3, схема 2). Главным местом модификации во всех случаях является основание C^5 -нуклеотида мишени. Кроме того, затрагиваются близлежащие к C^5 нуклеотиды C^1-A^9 . Аналогичное расширение основного локуса алкилирования (нуклеотиды C^1-A^9) наблюдалось и ранее [1] при модификации ДНК-мишени $pC_5A_5C_5$ (VII) реагентами, содержащими на 5'-конце остаток P_{нп}, а алкилирующую группировку — на 3'-конце цепи. Ранее [1, 18] наблюдалась также продукты модификации, не подвергающиеся расщеплению; эти соединения при модификации в присутствии эффектора обозначены как В'1—В'3 (рис. 4), их структура нами не установлена. Поскольку вблизи с реакционноспособной группировкой в комплексах В1—В3 расположен еще один нуклеофильный центр (5'-концевая фосфатная группа ДНК-мишени), способный в этих условиях подвергаться алкилированию [19], можно предположить, что соединение В'1 — В'3 — продукты модификации 5'-концевой фосфатной группы мишени. Это предположение требует специальных исследований. Результаты же, полученные в данной работе, свидетельствуют, что позиционная направленность алкилирования ДНК-мишени в присутствии эффектора алкилирующими реагентами на основе МФАО практически не отличается от позиционной направленности алкилирования реагентами на основе природных олигонуклеотидов, поскольку аналогичное МФАО (рис. 4а, б) распределение продуктов модификации наблюдается и в случае фосфодиэфирного октатимидилата, не содержащего метилфосфонатных остатков (рис. 4в).

Таким образом, олигонуклеотидные эффекторы, содержащие два остатка N-(2-гидроксиэтил)феназиния, могут быть использованы для повышения эффективности модификации ДНК-мишени не только в случае реагентов на основе природных фосфодиэфирных олигонуклеотидов [15, 16], но и в случае реагентов на основе МФАО. Роль эффекторов в этих случаях состоит в стабилизации комплементарных комплексов, образованных ДНК-мишенью и реагентом.

Повышение эффективности алкилирования в случае МФАО как для R_p -, так и S_p -изомеров имеет особое значение, поскольку открывает возможность более эффективного использования неразделенной смеси изомеров, получаемой при синтезе МФАО, а также позволяет эффективно воздействовать на НК-мишень короткими, т. е. более доступными, метилфосфонатными олигомерами.

Экспериментальная часть

Синтез и основные характеристики использованных в работе олигонуклеотидов и их алкилирующих производных описаны ранее [14, 17]. ^{32}P -Меченый олигонуклеотид (V) получали по методике [11].

Кривые плавления комплементарных комплексов олигонуклеотидов (0,2 М водный раствор NaCl, 0,01 М трис-HCl (pH 7,4), 0,01 М MgCl₂) регистрировали с помощью специальной установки, созданной на базе микроспектрофотометра «Обь-4» и микро-ЭВМ «Искра-226». Концентрация олигонуклеотидов в растворе во всех случаях составляли $1 \cdot 10^{-5}$ М.

5',3'-бис-N-(2-гидроксиэтил)феназиниевое производное олигонуклео-

тида (III) синтезировано по методике [13] исходя из гексануклеотида рСАТТГГТр, полученного триэфирным методом в растворе [20]. Олигонуклеотид (I) синтезирован твердофазным фосфитамидным методом на синтезаторе «Виктория 4М» [21].

Модификацию нонануклеотидной мишени (V) реакционноспособными производными (VIa—в) в присутствии эффектора (III) проводили аналогично ранее описанным методикам [18, 19] в буфере, содержащем 0,2 М NaCl, 0,01 М трис-HCl (рН 7,4), 0,01 М MgCl₂. Концентрации реагентов и эффектора в реакционной смеси составляли $2 \cdot 10^{-5}$ М, олигонуклеотида (V) — $1 \cdot 10^{-5}$ М.

Термические кривые модификации (рис. 3) построены исходя из значений предельной степени модификации олигонуклеотида (V) соответствующими реагентами (VIa—в) в зависимости от температурного режима реакции. Реакционную смесь, содержащую реагент, ³²P-меченый олигонуклеотид и эффектор, выдерживали при 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 и 55° С в течение 20, 10, 5 сут; 60; 29; 14; 8,5; 4,8; 2,4; 1,2 и 0,6 ч соответственно (время, составляющее более пяти периодов полупревращения реагента в активную промежуточную частицу [22]). Далее реакционные смеси подвергали электрофорезу в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины (рис. 2). По отношению радиоактивности продуктов модификации к сумме радиоактивности продуктов модификации и исходного немодифицированного олигонуклеотида (V) определяли предельную степень модификации ДНК-мишени (рис. 3, 2, 4, 6). Кривые 1, 3, 5 (рис. 3) были получены ранее в работе [18].

Позиционную направленность алкилирования олигонуклеотида (V) реагентами (VIa—в) (рис. 4) определяли аналогично описанным ранее методикам [18, 19]. Реакционную смесь, содержащую олигонуклеотид (V), эффектор (III) и соответствующие реагенты (VIa—в), выдерживали 20 сут при 8° С, подвергали расщеплению по остаткам алкилированных пуринов и по остаткам N3-алкилцитидинов. Расщепление модифицированного нонануклеотида по остаткам алкилированных пуринов проводили при 95—100° С 1 М пиперидином [23] в течение 10—16 ч, по остаткам N3-алкилцитидинов — обработкой модифицированной мишени смесью гидразин-гидрат — диоксан — вода (2 : 1 : 1 по объему) в течение 1,5—2 ч при 0° С с последующей обработкой пиперидином, как описано в работе [24]. По завершении указанных процедур олигонуклеотидный материал наносили на 20% ПААГ, содержащий 7 М мочевины, и подвергали электрофоретическому разделению. Полосы, соответствующие радиоактивным продуктам, вырезали и содержание радиоактивности измеряли в воде по Черенкову. Относительную степень модификации (%) определенного основания ДНК-мишени при ее алкилировании различными реагентами (рис. 4а—в) рассчитывали по отношению радиоактивности в соответствующей полосе геля к сумме радиоактивности во всех полосах.

Авторы выражают благодарность С. Г. Лохову за помощь при плавлении комплементарных комплексов олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амирханов И. В., Зарытова В. Ф. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 3. С. 370—378.
2. Miller P. S., Yano J., Yano E., Carroll C., Jayaraman K., Ts'O P. O. P. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5134—5143.
3. Miller P. S., Dreon N., Pulford S. M., McParland K. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 20. P. 9659—9665.
4. Miller P. S., McParland K. B., Jayaraman K., Ts'O P. O. P. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 7. P. 1874—1880.
5. Jayaraman K., McParland K., Miller P. S., Ts'O P. O. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1537—1541.
6. Marcus-Secure C. J., Worner A. M., Shinozuka K., Zon G., Quinnon Jr G. V. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 14. P. 5749—5764.
7. Agris C. H., Blake K. R., Miller P. S., Reddy M. P., Ts'O P. O. P. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 20. P. 6268—6275.
8. 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.

9. Blake K. P., Murakami A., Spitz S. A., Glave S. A., Reddy M. P., Ts' O P. O. P., Miller P. S. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 22. P. 6139—6145.
10. Blake K. R., Murakami A., Miller P. S. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 22. P. 6132—6138.
11. Murakami A., Blake K. R., Miller P. S. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 15. P. 4041—4046.
12. Miller P. S., Anman N. D., McParland K. B., Pulford S. M. // *Biochemistry*. 1982. V. 21. № 10. P. 2507—2512.
13. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
14. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Лохов С. Г. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. № 12. С. 1618—1626.
15. Kutyavin I. V., Poduminogin M. A., Vazhina Yu. N., Fedorova O. S., Knorre D. G., Levina A. S., Matayev S. V., Zarytova V. F. // *FEBS Letters*. 1988. V. 238. № 1. P. 35—38.
16. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Левина А. С., Мамаев С. В., Подьяминогин М. А. // *Докл. АН СССР*. 1988. Т. 302. № 1. С. 102—105.
17. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. № 2. С. 267—276.
18. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. № 3. С. 379—386.
19. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подьяминогин М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1220.
20. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // *Биоорганическая химия*. 1983. Т. 9. № 4. С. 518—521.
21. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полищук А. С., Потапов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Т., Шабарова З. А. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*. 1987. Вып. 1. № 2. С. 119—123.
22. Гринцева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чимитова Т. А. // *Биоорганическая химия*. 1977. Т. 3. № 2. С. 210—214.
23. Maxam A. M., Gilbert W. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499—560.
24. Kirkegaard K., Bus H., Spassky A., Wang J. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. № 9. P. 2544—2548.

Поступила в редакцию
17.VIII.1989

После доработки
20.II.1990

N. V. AMIRKhanov, V. F. ZARYTOVA, A. S. LEVINA
**REACTIVE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES BEARING
 METHYLPHOSPHONATE GROUPS**

VI. THE INCREASE IN THE EFFICIENCY OF DIRECTED EFFECT
 OF THE ALKYLATING METHYLPHOSPHONATE OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE
 DERIVATIVES ON NUCLEIC ACIDS IN THE PRESENCE OF EFFECTORS,
 3', 5'-bis-N-(2-HYDROXYETHYL)PHENAZINIUM DERIVATIVES
 OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

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

Effectors for increasing the efficiency of DNA modification with the alkylating methylphosphonate analogues of oligodeoxyribonucleotides (MFAO) were suggested. Oligodeoxyribonucleotide d(pC₅A₈ACAATG) used as a target DNA treated with alkylating derivatives of octathymidylate having alternating methylphosphonate and phosphodiester internucleotide bonds (both R_p- and S_p-individual diastereoisomers of MFAO were used) and bearing alkylating 4-(N-methyl-N-2-chloroethylamino)benzyl phosphoramidate residue at the 3'-end. The reactions were carried out in the presence of an effector, hexadeoxyribonucleotide derivative PhnNH(CH₂)₂NH_pCATTGT_pNH(CH₂)₂NHPhn bearing two N-(2-hydroxyethyl)phenazinium (Phn) residues at the 3'- and 5'-ends and being complementary to the part of the target DNA neighbouring with octaadenylate. It was shown that T_m of the duplex formed by the target DNA, octathymidylate and effector is by 7—13° C higher than in the absence of the effector, thus considerably increasing the efficiency of the intracomplex alkylation of the target (e. g., at 40° C, the increase for the reagent based on the R_p-isomer is sixfold). Specificity of the target DNA modification by the MFAO alkylating derivatives in the presence of effector is same as with reagents based on oligodeoxyribonucleotides with natural internucleotide bonds.