



УДК 577.113.4 + 615.779.9 : 543.422.25

© 1991 г.

*Т. С. Годовикова, В. Ф. Зарытова, Д. С. Сергеев***ПРЯМЫЕ РАЗРЫВЫ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА
ДНК БЛЕОМИЦИНОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА***Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Впервые осуществлено ковалентное присоединение дезоксирибоолигонуклеотида к противораковому антибиотику блеомицину A_5 . Реакция осуществлена между аминогруппой остатка спермидина медьсодержащего комплекса блеомицина A_5 ($Cu(II)Blm-RH$) и 5'-концевой фосфатной группой дезоксиолигонуклеотида $pCCAACA$ (I) (префикс «d» здесь и далее опущен) после предварительной ее активации смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии 4-N,N-диметиламинопиридин-1-оксида с образованием продукта $Cu(II)Blm-R-pCCAACA$ (Ia) с выходом 70%.

Показано, что соединение (Ia) образует более прочные комплементарные комплексы, чем исходный олигонуклеотид ($\Delta T = 11^\circ C$).

Продемонстрировано, что остаток блеомицина A_5 , ковалентно присоединенный к олигонуклеотиду (I), в присутствии ионов $Fe(II)$ способен почти количественно деструктурировать комплементарную матрицу $rTGTTCGCGAAGGA$ (II) с сохранением олигонуклеотидной части реагента (Ia) и олигонуклеотида $rTCCTTCG$ (III), комплементарного 3'-концу мишени, добавленного в исследуемую систему для формирования двойной спирали. Выявлено, что свободный блеомицин и блеомицин в составе (Ia) деструктурируют разные участки ДНК-мишени.

В настоящее время для сайт-специфической окислительной деструкции ДНК широко используются олигонуклеотиды, несущие остатки EDTA [1, 2], 1,10-фенантролина [3], порфирина [4]. Все они способны хелатировать переходные металлы и в той или иной мере имитировать активный центр противоопухолевых антибиотиков, например блеомицина. Известно, что блеомицин способен деструктурировать ДНК путем образования апуриновых или апиримидиновых сайтов [5] или путем одно- или двухцепочечных разрывов [6, 7]. Показано, что блеомицин предпочтительно разрывает GC- и GT-последовательности [8]. Полагают, что это обусловлено способностью концевой битиазольного фрагмента блеомицина сайт-специфически связываться с ДНК [9]. Активный центр блеомицина формируется другим участком молекулы: аминогруппой β -аминоаланина, азотами гетероциклов пиримидина и имидазола. Эти группы участвуют в связывании ионов металла, которые при окислении продуцируют активные формы кислорода, приводящие в результате к окислительной деструкции ДНК. Модификация группировок активного центра, как правило, делает антибиотик неактивным [10].

Исходя из известных свойств блеомицина, можно полагать, что олигонуклеотиды, содержащие остаток этого антибиотика, будут эффективными сайт-специфическими реагентами, способными «выключать» функцию определенных генов. Однако сложная структура блеомицина, включающая в себя несколько нуклеофильных центров, способных к реакции с активированными фосфатными группами олигонуклеотидов, опасность модификации металлсвязывающего центра требуют специальных разработок для получения олигонуклеотидных производных блеомицина.

В настоящей работе впервые описан метод получения блеомицинового

Сокращения: $Cu(II)Blm-RH$ — медьсодержащий комплекс блеомицина A_5 , где RH — остаток спермидина; $(PyS)_2$ — 2,2'-дипиридилдисульфид; $DMAPO$ — 4-N,N-диметиламинопиридин-1-оксид, префикс «d» (дезокс) в обозначениях олигонуклеотидов опущен.

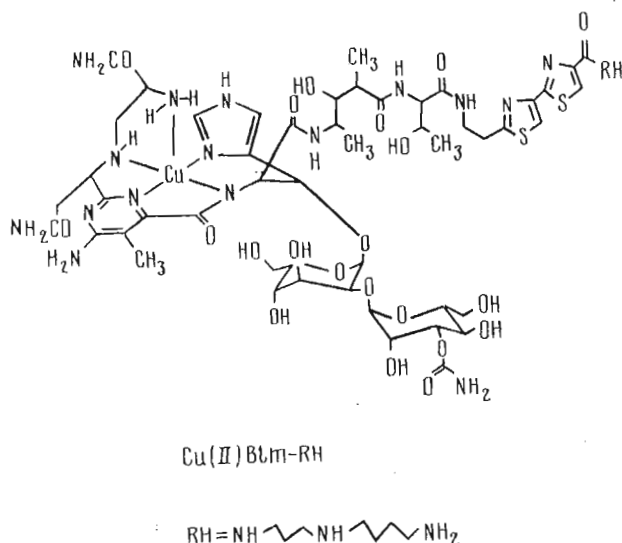
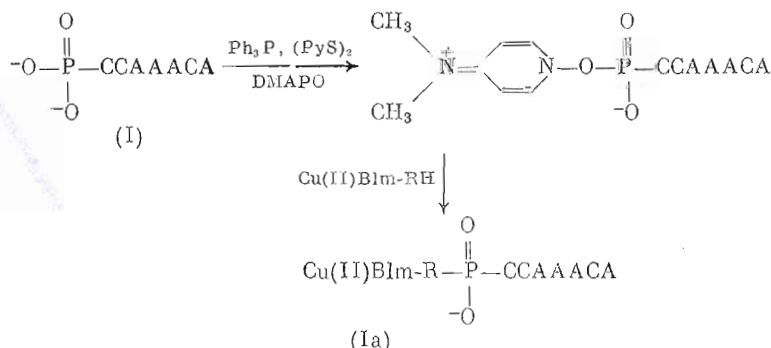


Рис. 1. Структура медьсодержащего комплекса блеомицина A_5

производного олигонуклеотида (Ia), исследована термостабильность дуплекса, образованного с его участием, и показана способность полученного реагента индуцировать прямые одноцепочечные разрывы фрагмента ДНК в составе комплементарного комплекса.

При конструировании блеомицинового производного олигонуклеотида, пригодного для сайт-специфической деградации ДНК-мишени, необходимо сохранить способность остатка антибиотика деградировать ДНК и одновременно способность олигонуклеотидной части синтезируемого реагента образовывать комплементарные комплексы.

С этой целью присоединение антибиотика к олигонуклеотиду проводили по 5'-концевой фосфатной группе, предварительно активированной смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии 4-N,N-диметиламинопиридин-1-оксида [11]. Известно, что активированная таким образом цвиттер-ионная фосфатная группа (схема 1) легко реагирует с алифатическими аминогруппами. Блеомицин A_5 в своей структуре содержит два участка с аминогруппами: остаток спермидина (RH) и металлсвязывающий домен, ответственный за деградацию ДНК (рис. 1). Для того чтобы сохранить активность антибиотика, необходимо дискриминировать эти аминогруппы и исключить проведение реакции по металлсвязывающему центру. С этой целью в реакцию с активированной цвиттер-ионной фосфатной группой вводили медьсодержащий комплекс блеомицина A_5 (схема 1). Во избежание присоединения двух молекул олигонуклеотида к одной молекуле антибиотика использовали 10-кратный избыток последнего:



Образующийся продукт (Ia) выделяли обращенно-фазовой хроматографией. На рис. 2 видно, что (Ia) элюируется между исходным олигонуклео-

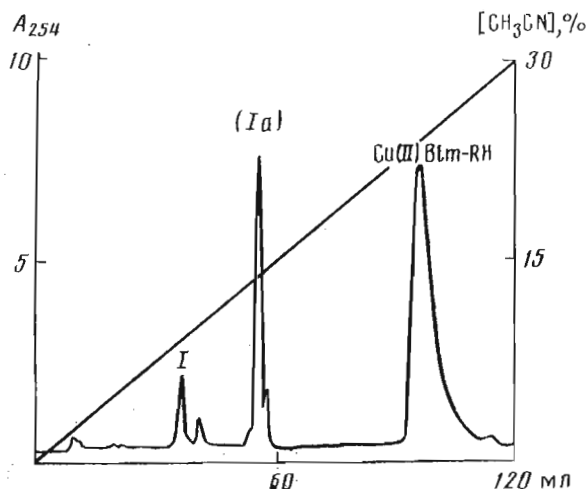


Рис. 2. Профиль обращенно-фазовой хроматографии реакционной смеси при синтезе блеомицинового производного олигонуклеотида (Ia). Колонка (4,6 × 250 мм) с носителем Lichrosorb RP-18, 10 мкм, градиент концентрации ацетонитрила 0–30% в 0,05 М LiClO₄

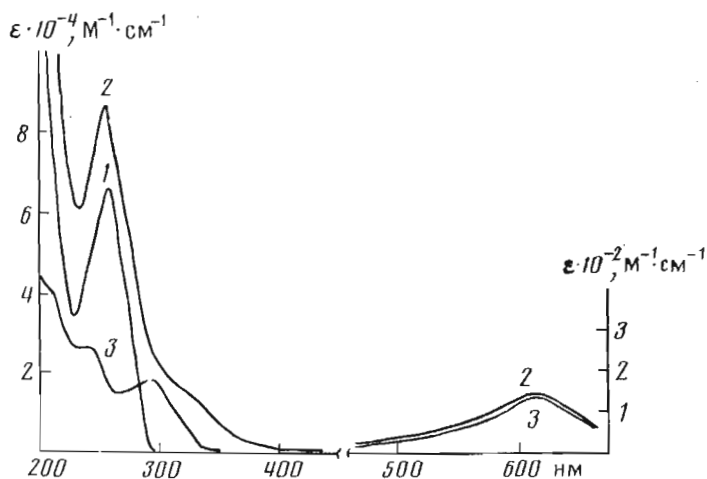


Рис. 3. Электронные спектры поглощения соединений: олигонуклеотида (1) (I), его блеомицинового производного (Ia) (2) и медьсодержащего комплекса блеомицина A₅ (Cu(II)Blm-RH) (3)

тидом и антибиотиком. Индивидуальность выделенного продукта (Ia) подтверждена ионообменной хроматографией, где он в соответствии со своей структурой элюируется как соединение, имеющее на 2–3 заряда меньше, чем исходный олигонуклеотид. Выход соединения (Ia) не менее 70%.

В электронном спектре поглощения производного (Ia) присутствует полоса при 260 нм, характерная для нуклеотидной компоненты, и плечо при 290–320 нм, характерное для спектров поглощения блеомицинов [12]. Кроме того, появляется полоса поглощения при 610 нм ($\epsilon = 1 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), которая указывает на наличие блеомицина в составе синтезированного продукта в форме хелатного комплекса с ионами меди (рис. 3). Отношение $\epsilon_{600}/\epsilon_{260} = 1,57 \cdot 10^{-3}$ для соединения (Ia) практически совпадает с расчетной величиной $\epsilon_{600}/\epsilon_{260} = 1,58 \cdot 10^{-3}$ при стехиометрии присоединения олигонуклеотида к антибиотику 1 : 1.

Фосфамидный тип образующейся между олигонуклеотидом и антибиотиком связи подтверждается кислотным гидролизом соединения (Ia): после выдерживания этого соединения при pH 3,5 и 37 °C в течение 16 ч ионообменной хроматографией регистрируется только исходный олигонуклеотид.

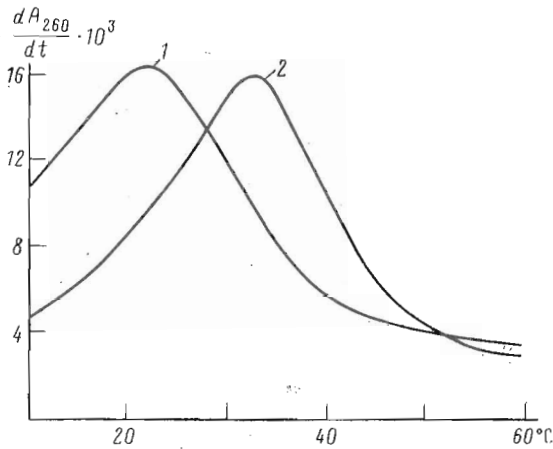


Рис. 4. Дифференциальные кривые термической денатурации комплементарных комплексов (I) + (II) (1) и (Ia) + (II) (2) при концентрации компонентов $2,5 \cdot 10^{-5}$ M в $0,16$ M NaCl, $0,02$ M Na_2HPO_4 , $0,1$ mM EDTA (pH 7,4)

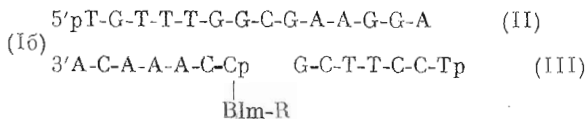
Вышеизложенные данные, а также способность ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду блеомицина расщеплять ДНК (см. ниже) свидетельствуют о том, что олигонуклеотид присоединен не по металл-связывающему центру, а по остатку спермидина. Однако для окончательного вывода, по какой из аминогрупп спермидинового остатка антибиотика происходит присоединение олигонуклеотида, необходимы дополнительные данные.

Блеомициновое производное олигонуклеотида (Ia) достаточно стабильное соединение. По данным хроматографического анализа, не наблюдается появления продуктов деградации (Ia) при хранении его в течение месяца в виде $3 \cdot 10^{-5}$ M водного раствора при -10°C .

Известно, что эффективность сайт-специфического воздействия на ДНК в большой мере зависит от стабильности образующегося между ДНК-мишенью и реагентом комплементарного комплекса [13]. Влияние антибиотика на комплексообразующие свойства олигонуклеотидов оценивали путем сравнения температуры плавления комплексов, образованных рТGTTTGCGGAAGGA с участием рССАААСА и его блеомицинового производного. Температура плавления дуплекса, образованного блеомициновым производным, на 11°C выше температуры плавления дуплекса, сформированного с участием исходного олигонуклеотида (рис. 4). Следовательно, введение в олигонуклеотид объемного антибиотика не только не снизило способности олигонуклеотида к комплексообразованию, но даже усилило ее. Возможно, это обусловлено способностью тиазолового участка антибиотика связываться с ДНК [14].

В данном случае важно то, что сконструированное производное (Ia) способно образовывать более прочные комплексы, чем исходный олигонуклеотид, и, следовательно, более эффективно влиять на функцию ДНК-мишени. Повышенная эффективность воздействия по сравнению с олигонуклеотидом должна сохраниться даже в том случае, если введенный в олигонуклеотид антибиотик не будет деструктурировать ДНК.

В нашем же случае остаток блеомицина, ковалентно присоединенный к олигонуклеотиду, сохраняет свою деградирующую функцию. Это было продемонстрировано при изучении дуплекса А:



В качестве матрицы использовали 14-звенный олигонуклеотид, содержащий на 5'-конце ^{32}P -метку. Помимо реагента (I6) использовали 7-членный олигонуклеотид (II), комплементарный 3'-концу матрицы, с целью имитации взаимодействия антибиотика с двойной спиралью. Известно, что комплекс $\text{Fe}(II)$ ·блеомицин в присутствии кислорода и восстанавливающих агентов способен эффективно расщеплять ДНК [15]. Поэтому моди-

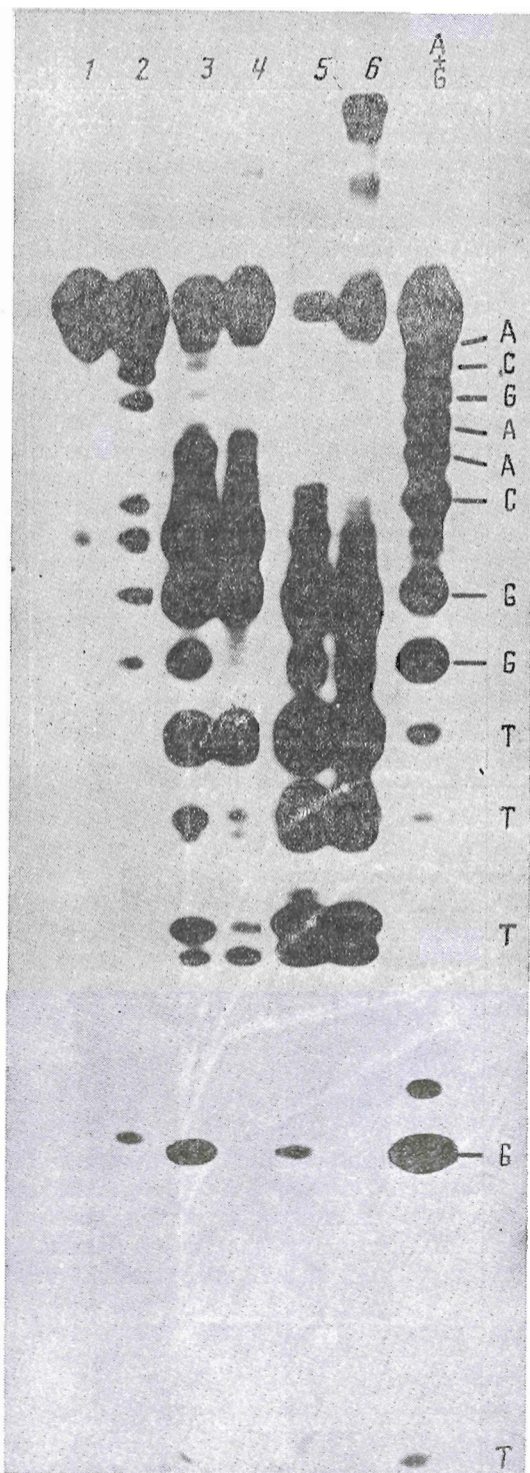


Рис. 5

Рис. 5. Результаты электрофоретического анализа деструкции ^{32}P -меченой мишени (II) в присутствии олигонуклеотида (I) реагентом (16) (5, 6) или свободным блеомицином A_5 (3, 4). В контрольном эксперименте (1, 2) (16) заменяли на (I). Концентрация всех олигонуклеотидных компонентов и блеомицина A_5 $1 \cdot 10^{-5}$ М. Реакционные смеси объемом 20 мкл, содержащие также $1 \cdot 10^{-5}$ М олигонуклеотид (II), $1 \cdot 10^{-4}$ М $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, 0,05 М 2-меркаптоэтанол, 0,2 М LiCl , 0,01 М трис- HCl (рН 7,5), инкубировали 9 ч при 20°C . Дорожки 2, 3 и 5 — реакционные смеси подвергались обработке 1 М пиперидином (95°C , 45 мин), дорожки 1, 4 и 6 — без обработки реакционных смесей пиперидином. Дорожка (A + G) — секвенирование мишени (II) по Максиму — Гилберту

Рис. 6. Распределение продуктов деструкции ^{32}P -меченой мишени (II) реагентом (16) (a), свободным блеомицином A_5 (б). Общий процент деструкции мишени равен соответственно 80 и 59%

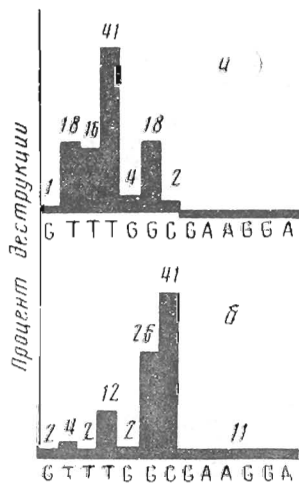


Рис. 6

фикацию мишени (II) проводили в присутствии ионов $\text{Fe}(\text{II})$, предварительно удалив ион меди из соединения (Ia) с образованием (Iб).

Модификацию матрицы (II) блеомициновым производным олигонуклеотида (Iб) (дуплексе А) оценивали по данным гель-электрофореза (рис. 5). Двоение пятен на радиоавтографе как в случае олигонуклеотидного реагента, так и свободного блеомицина, вероятно, обусловлено образованием продуктов деструкции мишени, сходных по структуре. Известно, что

при деградации ДНК блеомицином образуются продукты, несущие 3'-фосфат или 3'-фосфогликолят [16]. Из рис. 5 видно, что матрица (II) эффективно деградировала при действия как свободного антибиотика (59%) (дорожка 3), так и связанного с олигонуклеотидом (80%) (дорожка 5). Расщепление матрицы (II) в случае замены реагента на исходный олигонуклеотид составляет 22%, а при отсутствии Fe(II) и 2-меркаптоэтанола — 11%.

Помимо разрывов зарегистрировано небольшое количество сшивок (дорожки 4 и 6), которые исчезают при обработке пиперидином. Важно то, что для соединения (I6), так же как и для блеомицина A_5 , регистрируется высокая степень прямых разрывов мишени (80—60%). Обработка реакционной смеси пиперидином приводит к незначительному выявлению скрытых разрывов (рис. 5, ср. дорожки 3 и 4, 5 и 6).

Из данных рис. 5 и 6 видно, что продукты расщепления мишени (II) реагентом (I6) и свободным блеомицином A_5 различаются. Деструкция мишени (II) реагентом (I6) наблюдается в районе T³-T⁴-T⁶ и G⁶-G⁷ и практически отсутствует расщепление между G²-C⁸, наиболее характерное для действия свободного блеомицина A_5 (рис. 6а, б). Вероятно, различия в сайтах разрывов мишени (II) обусловлены тем, что в случае производного (I6) олигонуклеотид определяет участок взаимодействия ковалентно связанного с ним блеомицина. В исследуемом случае соединение (I6) повреждает мишень «под реагентом» и практически не затрагивает район от C⁸ до A¹⁴.

В условиях почти полного расщепления матрицы (II) реагент (I6) и олигонуклеотид (III) не подвергаются действию блеомицинового остатка реагента (I6). Это было показано следующим образом. Поочередно ³²P-меченые (I6) и (III) выдерживали в условиях реакции с немеченой мишенью (II) и подвергали обработке пиперидином. Реагент (I6) дополнительно выдерживали 16 ч при pH 3,5 для удаления остатка антибиотика. Анализ электрофорезом показал практически полную сохранность длины обоих олигонуклеотидов.

Таким образом, предложен метод получения блеомицинового производного олигонуклеотида, способного осуществлять прямые разрывы ДНК-мишени. Показано, что в исследуемой системе оно не проявляет активности по отношению к собственной олигонуклеотидной части и к олигонуклеотиду, соседствующему с этим реагентом.

Экспериментальная часть

Дезоксиолигонуклеотиды pCCAAACA (I), pTGTTTGCGGAAGGA (II) и pTCSTTCG (III) синтезировали модифицированным триэфирным методом [17]. Использовали гидрохлорид блеомицина A_5 (95% основного вещества) производства опытного завода Института органического синтеза АН ЛатвССР, трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид (Fluka AG, Швейцария) и 4-N,N-диметиламинопиридин-1-оксид, полученный по методике [18].

³²P-Меченые олигонуклеотиды (I), (II) и (III) получали по методике [19], используя [γ -³²P]ATP (3000 Ки/ммоль, отечественное производство), T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и ADP.

Молярные коэффициенты поглощения соединения (II) ($\epsilon_{260} = 140 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и (III) ($\epsilon_{260} = 57 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) определяли по методике [20], для (I) ($\epsilon_{260} = 66 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) определен ранее [21] методом полного фосфодиэстеразного гидролиза. Молярный коэффициент поглощения производного (Ia) ($\epsilon_{260} = 86 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) определен методом радиоизотопной метки [21].

Электронные спектры поглощения записывали на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Iena, ГДР) в буферном растворе 0,2 M LiCl, 0,01 M трис-HCl, pH 7,5 (рис. 3).

Температуру плавления комплементарных комплексов (I) + (II) и (Ia) + (II) определяли на установке для термической денатурации на базе хроматографа «Милихром» в буферном растворе 0,16 M NaCl, 0,02 M

Na_2HPO_4 , 0,1 мМ EDTA (рН 7,4) при концентрации компонентов $2,5 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 4).

Медьсодержащий комплекс блеомицина A_5 получали, добавляя к $5 \cdot 10^{-6}$ моль гидрохлорида блеомицина A_5 1,5-кратный мольный избыток раствора CuSO_4 и обессоливая продукт на обращенно-фазовом носителе Lichroprep RP-18 (5–20 мкм, Merck, ФРГ).

Синтез блеомицинового производного олигонуклеотида (Ia). $1 \cdot 10^{-7}$ моль цетавлоновой соли (I) растворяли в 40 мкл диметилсульфоксида, добавляли 3,5 мг Pb_3P , 3 мг $(\text{PyS})_2$ и 1,5 мг ДМАРО. После 10 мин инкубации промежуточное цвиттер-ионное производное олигонуклеотида (I) (схема 1) отделяли от остальной реакционной смеси и добавляли $1 \cdot 10^{-6}$ моль (1,5 мг) гидрохлорида медьсодержащего комплекса блеомицина A_5 в 40 мкл 0,2 М NaHCO_3 (рН 8,5). Инкубировали данную смесь 6 ч и продукт выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2). Выход 70%.

Полученное блеомициновое производное олигонуклеотида (Ia) выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Altex-332 (США) на колонках (4,6 × 250 мм) с носителем Lichrosorb RP-18 (10 мкм, Merck, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила 0–30% в 0,05 М LiClO_4 . Ионообменную ВЭЖХ продукта (Ia) осуществляли на аналогичных колонках с носителем Полисил СА [22] в градиенте концентрации 0,02 → 0,3 М KH_2PO_4 (рН 6,5) в 30% водном ацетонитриле.

Кислотный гидролиз производного (Ia) проводили в 0,1 М CHOOHNa (рН 3,5) при 37° С. Степень гидролиза определяли через 0,5, 1, 3 и 16 ч по отношению площадей пиков (I) и (Ia) на профиле ионообменной хроматографии.

Извлечение ионов меди из медьсодержащего комплекса остатка антибиотика в соединении (Ia) осуществляли на микроколонках (1 × 50 мм) с носителем Lichrosorb RP-18 (10 мкм, Merck, ФРГ), промывая $1 \cdot 10^{-8}$ моль (Ia) последовательно 2,5 мл 0,1 М EDTA (рН 6,3), 0,5 мл 0,05 М LiClO_4 и элюируя производное (Ib) 0,4 мл 20% ацетонитрила в 0,05 М LiClO_4 со скоростью 0,05 мл/мин на аналитическом хроматографе «Милихром».

Деградацию ^{32}P -меченой мишени (II) проводили в 0,2 М LiCl , 0,04 М трис- HCl (рН 7,5), при концентрации компонентов (Ib), (II) и (III) $1 \cdot 10^{-5}$ М, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ $1 \cdot 10^{-4}$ М и 2-меркаптоэтанола 0,05 М при 20° С в течение 9 ч. В контрольных экспериментах заменяли (Ib) на свободный блеомицин A_5 и (I) (оба $1 \cdot 10^{-5}$ М) или только на (I) ($1 \cdot 10^{-5}$ М).

Реакционные смеси, не обработанные или обработанные 1 М пиперидином в течение 45 мин при 95° С, подвергали электрофорезу в 20% ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 5). После радиоавтографии геля на пленку РМ-В участки, содержащие радиоактивный материал, вырезали и определяли их радиоактивность в воде по Черенкову на жп костном сцинтилляционном счетчике Rackbeta (Wallac LKB, Финляндия).

Определяя общую степень дегградации мишени, а также степени дегградации по каждому положению (рис. 6), вычитали из данных эксперимента (рис. 5, 3 и 5) данные по дегградации в контрольном эксперименте (рис. 5, 2), т. е. при замене реагента (Ib) на олигонуклеотид (I). При определении распределения продуктов дегградации не учитывалось расщепление по первому положению с 5'-конца мишени, поскольку радиоактивный материал в процессе обработок до нанесения на гель теряется. Радиоактивный материал, соответствующий по длине от 8 до 13 нуклеотидов, просчитывался без разделения.

В условиях дегградации мишени определяли устойчивость ^{32}P -меченого олигонуклеотида (III), проводя анализ как описано выше.

Радиоактивный реагент (Ib) выделяли по приведенной выше методике и инкубировали в условиях дегградации мишени (II). При анализе сохранности нуклеотидной части реагента (Ib) реакционную смесь после реакции обрабатывали пиперидином и выдерживали 16 ч при рН 3,5 и 37° С для полного гидролиза фосфамидной связи, соединяющей олигонуклеотидную часть с остатком антибиотика, после чего подвергали электрофорезу.

Авторы благодарят С. Г. Лохова за помощь в определении температур плавления комплементарных комплексов олигонуклеотидов, Н. Н. Ломакину и В. В. Власова за интерес к работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boutorin A. S., Vlassov V. V., Kazakov S. A., Kutjavin I. V., Podyminogin M. A.* // FEBS Lett. 1984. V. 172. № 1. P. 43—46.
2. *Chu B. S. F., Orgel L. E.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 963—967.
3. *Chen C. B., Sigman D. S.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 19. P. 7147—7151.
4. *Le Doan T., Perrouault L., Helene C., Chassignol M., Thuong N. T.* // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6736—6739.
5. *Ross S. L., Moses R. E.* // Biochemistry. 1978. V. 17. № 2. P. 581—586.
6. *Suzuki H., Nagai K., Acutsu E., Yamaki H., Tanaka N., Umezawa H.* // J. Antibiot. 1970. V. 23. № 10. P. 473—480.
7. *Povirk L. F., Wubker W., Kohnlein W., Hutchinson F.* // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 10. P. 3573—3580.
8. *Sugiyama H., Kilkuskie R. E., Hecht S. M., van der Marel G. A., van Boom J. H.* // J. Amer. Chem. Soc. 1985. V. 107. № 25. P. 7765—7767.
9. *Kuwahara J., Sugiura Y.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 8. P. 2459—2463.
10. Антибиотики-полипептиды / Ред. Егоров П. С. М.: МГУ, 1987. С. 234—250.
11. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Мальцева Т. В., Халимская Л. М.* // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1246—1252.
12. *Зенкова В. А., Юрина М. С., Ломакина Н. Н., Гольдберг Л. Е., Бажанов В. С., Кунрат И. А.* // Антибиотики. 1979. Т. 24. № 3. С. 175—179.
13. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1212—1220.
14. *Povirk L. F., Hogan M., Dattagupta N.* // Biochemistry. 1979. V. 18. № 1. P. 96—101.
15. *Sausville E. A., Peisach J., Horwitz S. B.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 73. № 3. P. 814—822.
16. *Stubbe J., Kozarich J. W.* // Chem. Rev. 1987. V. 87. № 5. P. 1107—1136.
17. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П.* // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
18. *Katritzky A. R.* // J. Chem. Soc. 1956. № 7. P. 2404—2408.
19. *Berkner K. L., Folk W. R.* // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3176—3184.
20. *Santor C. R., Tinoco I.* // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65.
21. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
22. *Ястребов С. И.* / Способ получения сорбента.: А. с. 1153976 СССР // Б. И. 1985. № 17. С. 28.

Поступила в редакцию
16.I.1991

T. S. GODOVIKOVA, V. F. ZARYTOVA, D. S. SERGEYEV

DIRECT CLEAVAGE OF A DNA FRAGMENT BY A BLEOMYCIN A₃- OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE

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

A method for coupling bleomycin to oligonucleotides is suggested. The reaction was carried out between the amino group of the spermidine residue of the bleomycin A₃ Cu(II)-complex (Cu(II)Blm-RH) and the 5'-phosphate group of the oligonucleotide pd(CCAAACA) (I) activated with a mixture of triphenylphosphine and 2,2'-dipyridyldisulphide in the presence of 4-N,N-dimethylaminopyridine-1-oxide. The resultant compound (Ia) (yield 70%) forms more stable complementary complexes than the parent oligonucleotide ($\Delta T_m = 11^\circ \text{C}$). When Cu(II) ion was removed from (Ia), compound (Ib) formed which effectively (80%) cleaved pd(TGTTTGCCGAAGGA). Neither pd(TCCTTCG) nor the oligonucleotide tail of the reagent (Ib) were destroyed under the cleavage conditions. Free Blm-RH and bleomycin bound in the reagent (Ib) damage different regions of the target.