



УДК 577.113(4+7)

© 1992 г. В. Ф. Зарытова, И. В. Кутявин, С. В. Мамаев,
М. А. Подыминов

САЙТ-НАПРАВЛЕННАЯ ХИМИЧЕСКАЯ РЕСТРИКЦИЯ
ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА ДНК АЛКИЛИРУЮЩИМ
ПРОИЗВОДНЫМ ТЕТРАНУКЛЕОТИДА d(pApGpCpA)
В ПРИСУТСТВИИ ТЕТРАНУКЛЕОТИДНЫХ ЭФФЕКТОРОВ

Новосибирский институт биорганической химии СО РАН

Реакцией алкилирования полинуклеотидной мишени 5'-О-фосфорил-4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензил-амидным производным тетрадезоксирибонуклеотида d(pApGpCpA) осуществлена с выходом 21–39% направленная химическая рестрикция 302-членного одноцепочечного фрагмента ДНК по остаткам гуанозинов в сайтах ...pTpCrCrT... В качестве эффекторов использованы 3',5'-ди-N-(2-гидроксиэтил)феназиновые производные тетрануклеотидов. Показано, что применение пары тетрануклеотидных эффекторов, фланкирующих реакционноспособное производное тетрануклеотида при образовании комплекса с ЦК-мишенью, реагент может быть направлен избирательно только в один из трех имеющихся на фрагменте ДНК сайтов алкилирования. Выход реакции направленной химической рестрикции зависит от концентрации как реагента, так и эффекторов в смеси. Эффективность адресованного алкилирования и рестрикции может быть повышена с помощью блоков, состоящих из четырех и более эффекторов. Ближайшими к реагенту эффекторами в этом случае должны быть обязательно 3',5'-ди-Pnp-производные тетрануклеотидов.

Несмотря на бурное развитие в последние десятилетия методов генной инженерии, проблема направленного химического расщепления нуклеиновых кислот не теряет своей актуальности. Связано это в первую очередь с отсутствием в природе так называемых крупноцепных рестриктаз, необходимых для установления первичной структуры таких макромолекулярных объектов, как индивидуальные хромосомы эукариот. В случае одноцепочечных НК применение молекулярно-биологических подходов невозможно, так как необходимые для этого рестриктазы в природе не обнаружены. Однако решить проблему направленного расщепления одноцепочечных НК позволяют химические методы. Так, в ряде публикаций [1–3], посвященных комплементарно адресованной модификации НК, была продемонстрирована принципиальная возможность направленного химического расщепления одноцепочечных полидезоксирибонуклеотидов CIRCH₂NH-производными олигонуклеотидов. Однако внедрение этого подхода в научно-исследовательскую практику ограничивает достаточно широкая позиционная направленность действия указанных реагентов. Ранее было показано [4–6], что в комплементарном комплексе реакционноспособный CIRCH₂NH-остаток может алкилировать не только ближайшие к нему основания мишени, не участвующие в комплементарном связывании, но и основания, входящие в структуру сайта узнавания реагента. Это значительно снижает выход целевого продукта рестрикции и требует его выделения из сложной смеси близких по длине фрагментов.

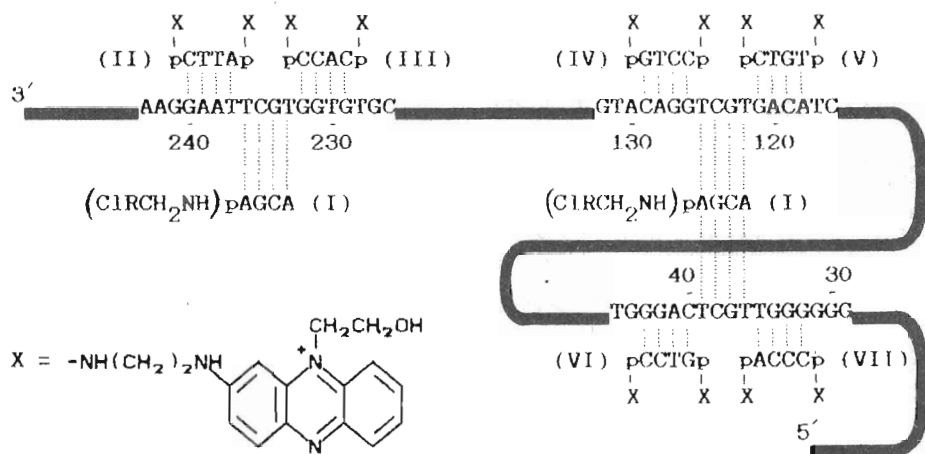
Сокращения: префикс «d» в аббревиатуре олигонуклеотидов означает: ДНК – дезоксирибонуклеиновые кислоты; CIRCH₂NH – остаток 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензил-амид; Pnp – остаток N-(2-гидроксиэтил)феназила.

Проблема алкилирования полинуклеотидной мишени 5'-ClRCH₂NH-производными олигонуклеотидов преимущественно по одному, заранее определенному основанию может быть решена в рамках предложенного нами эффекторного варианта комбинированно адресованной модификации нуклеиновых кислот [4, 5, 7]. В предыдущей работе [7] было показано, что введение в реакционную смесь олигонуклеотидного эффектора, контактирующего с 5'-концевой частью реагента на мишени, препятствует алкилированию оснований полинуклеотида, входящих в сайт узнавания данного эффектора. Это значительно ограничивает число оснований мишени, подвергающихся модификации 5'-ClRCH₂NH-производными олигонуклеотидов. При этом алкилируются лишь те основания мишени, которые участвуют в связывании реагента. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение возможности сайт-специфической модификации одноцепочечных НК реакционноспособными производными с коротким олигонуклеотидным адресом в присутствии коротких Rph-содержащих олигонуклеотидных эффекторов, что открывало бы перспективу унификации процесса направленной химической рестрикции.

Так как в сайте узнавания реагента 5'-ClRCH₂NH-остаток способен наиболее эффективно алкилировать третье от него пуриновое основание мишени [1-6], желательно, чтобы третьим с 5'-конца реагента располагался остаток пиримидина в окружении двух пуринов. Все это учитывалось при синтезе ClRCH₂NH-содержащего тетра-нуклеотидного реагента.

В качестве мишени в работе использовали 302-членный одноцепочечный фрагмент ДНК [3], который подвергали алкилированию тетра-нуклеотидным реагентом (I), имеющим на фрагменте три сайта полного комбинированного связывания (схема 1).

Схема 1



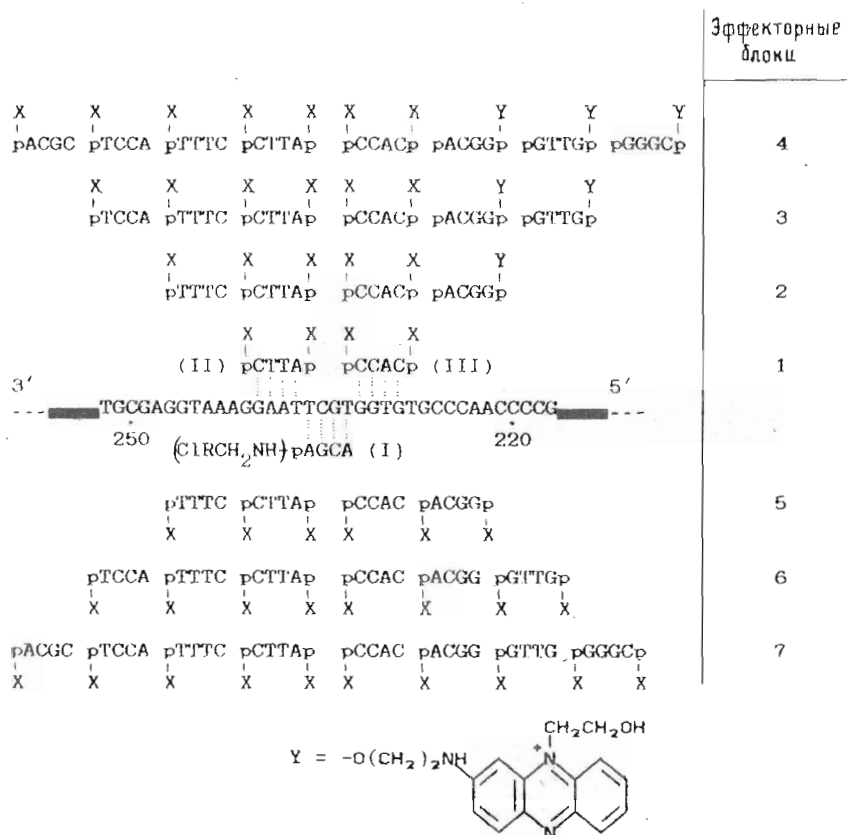
Для стабилизации комплекса реагента (I) с мишенью в качестве эффекторов использовали 3',5'-ди-Rph-производные тетра-нуклеотидов (II) - (VII). Как видно из рис. 1, введение в реакционную смесь, содержащую ДНК-фрагмент и реагент (I), дополнительно двух тетра-нуклеотидных эффекторов (II) и (III) вызывает алкилирование, а после обработки 10% пиперидином и расщепление мишени по основанию G²³⁴. При этом эффективность химической рестрикции по указанному центру зависит от концентрации как реагента (рис. 1, дорожки 3-5), так и эффекторов (дорожки 1-3). Максимальный выход рестрикции фрагмента ДНК по основанию G²³⁴ (дорожка 3) составляет 39%. Эффектор (II), как и ожидалось, блокирует алкилирование оснований A²³⁶ - G²⁴⁰, входящих в сайт

его комплементарного связывания с мишенью. Модификация этих остатков становится заметной лишь при снижении концентрации эффекторов в реакционной смеси, но во всех случаях не превышает 1–2% (дорожки 2, 3).

Продукты химической рестрикции полинуклеотида по остаткам G^{123} и G^{37} , входящим в структуру двух других сайтов модификации, были получены с выходом 26 и 21% соответственно при введении в реакционную смесь попарно эффекторов (IV) и (V), (VI) и (VII) (рис. 2). На основании рис. 2 можно говорить о строгой селективности химической рестрикции фрагмента ДНК тетрапуклеотидным реагентом (I) в присутствии тетрапуклеотидных эффекторов. Каждая пара эффекторов способствует алкилированию мишени только в одном из трех возможных сайтов модификации реагентом (I). При этом какие-либо продукты алкилирования мишени по двум другим сайтам не регистрируются.

Исходя из данных работы [7] можно было ожидать, что замена одного тетрапуклеотидного эффектора на тандемный блок, состоящий из двух и более тетрапуклеотидных эффекторов, положительно повлияет на эффективность направленного алкилирования мишени реагентом (I). Чтобы проверить это предположение, мы получили 3'-Phn, 5'-Phn- и 3',5'-ди-Phn-производные тетрапуклеотидов, способные образовывать в районе сайта узнавания реагента $T^{233} - T^{236}$ эффекторные блоки (схема 2).

Схема 2



Исследования показали, что замена тетрапуклеотидных эффекторов (II) и (III) (блок 1) на эффекторный блок 2 (схема 2) сопровождается увеличением выхода химической рестрикции фрагмента ДНК по основа-

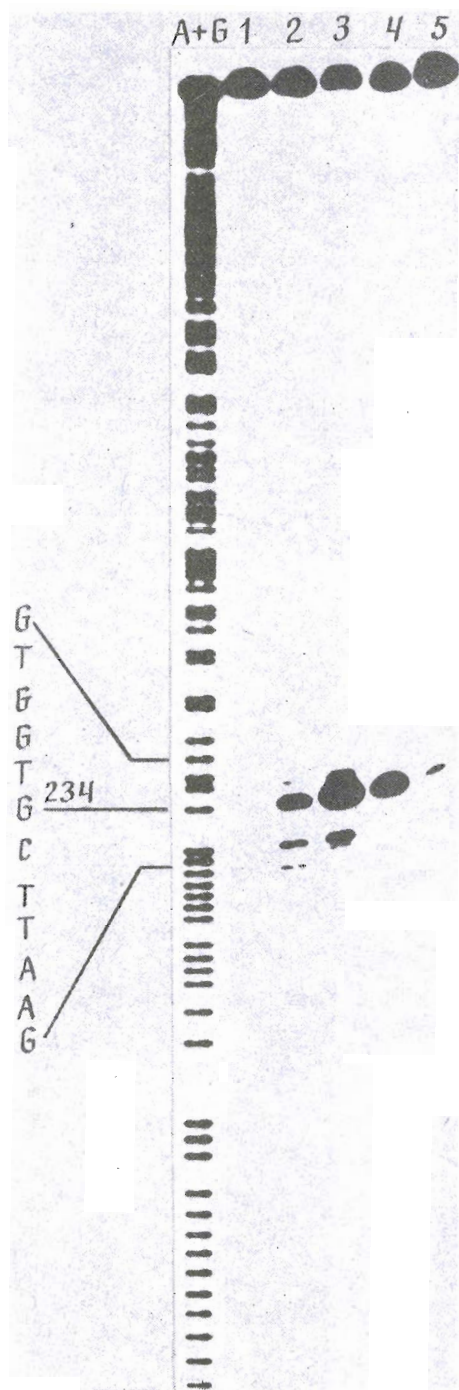


Рис. 1

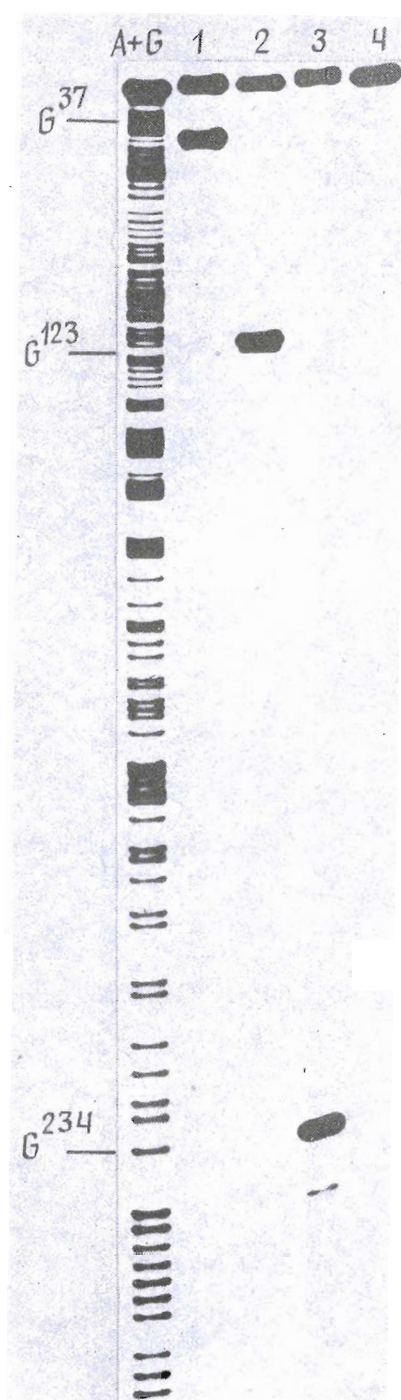


Рис. 2

нию G^{234} с 15 до 24%*. Дальнейшее увеличение протяженности эффекторного блока в случае блоков 3 и 4 не приводит к значительному изменению выхода реакции.

Важно отметить, что для достижения максимально возможной модификации мишени ближайшими к реагенту эффекторами должны быть обязательно 3',5'-ди-Rhp-производные тетрануклеотидов. Так, при переходе от эффекторного блока 1 к блокам 5 и 6 (схема 2), где ближайшим к 3'-концу реагента эффектором оказывается 5'-моно-Rhp-производное тетрануклеотида, выход реакции уменьшается до 7–8% и восстанавливается лишь при использовании эффекторного блока 7 (14%).

Тот факт, что эффективное адресованное алкилирование фрагмента ДНК в настоящей работе было осуществлено с использованием коротких тетрануклеотидных производных, имеет очень важное значение, поскольку открывает принципиальную возможность унификации процесса направленной химической рестрикции посредством создания банка реагентов и всех возможных по нуклеотидному составу эффекторов. При этом, как видно из рис. 2, достаточно высокая степень модификации ДНК-мишени достигается уже при использовании в качестве эффекторов только двух 3',5'-ди-Rhp-производных тетрануклеотидов.

Экспериментальная часть

Все использованные в работе тетрануклеотиды были получены модифицированным триэфирным методом синтеза [8], исходя из полностью блокированных динуклеотидов опытного химического производства НИОХ СО АН СССР. 3'-Моно-Rhp- [9], 5'-моно-Rhp- [10] и 3',5'-ди-Rhp-производные [7] тетрануклеотидов синтезировали, выделяли и характеризовали в соответствии с методиками указанных работ. Тетрануклеотидный реагент (I) был получен по методу [11]. Содержание хлора в реагенте, определенное по методике [10], превышало 90% от теоретического.

Концентрацию производных тетрануклеотидов в водных растворах определяли спектрофотометрически, используя молекулярные коэффициенты поглощения, рассчитанные как описано в работе [7]. В экспериментах по направленной химической рестрикции в качестве мишени использовали 302-членный одноцепочечный фрагмент ДНК, первичная структура которого и методика 3'- 32 P-мечения описаны ранее [3]. Алки-

Рис. 1. Радиоавтограф 8% денатурирующего ПААГ после разделения продуктов химической рестрикции фрагмента ДНК, полученных в результате алкилирования последнего реагентом (I) в присутствии эффекторов (II), (III) и пиперидинолиза. Исходные реакционные смеси содержали (концентрация, М): фрагмент ДНК – $1 \cdot 10^{-8}$; реагент (I) – $5 \cdot 10^{-5}$ (дорожки 1–3), $5 \cdot 10^{-6}$ (дорожка 4) и $5 \cdot 10^{-7}$ (дорожка 5); эффекторы (II), (III) – $5 \cdot 10^{-7}$ (дорожка 1), $5 \cdot 10^{-6}$ (дорожка 2) и $5 \cdot 10^{-5}$ (дорожки 3–5). Дорожка A+G (здесь и на рис. 2) – продукты статистического расщепления ДНК-фрагмента по остаткам пуринов. Реакцию алкилирования проводили 25 ч при 25°C

Рис. 2. Радиоавтограф 8% денатурирующего полиакриламидного геля, в котором разделены продукты химической рестрикции фрагмента ДНК после алкилирования реагентом (I) (дорожки 1–4) в присутствии эффекторов (VI), (VII) (дорожка 1), (IV), (V) (дорожка 2), (II), (III) (дорожка 3) и последующего пиперидинолиза. Реакционные смеси исходно содержали ДНК-фрагмент $1 \cdot 10^{-8}$, реагент (I) и эффекторы (II)–(VIII) – $5 \cdot 10^{-5}$ М. Условия реакции алкилирования те же, что и в подлиннике рис. 1

* Более низкий выход реакции химической рестрикции фрагмента ДНК реагентом (I) в присутствии эффекторов (II) и (III) в сравнении с упоминавшейся выше величиной (39%) объясняется тем, что в экспериментах с эффекторными блоками 1–7 в отличие от условий реакции, приведенных на рис. 1, 2, реакционные смеси исходно содержали реагент и эффекторы в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М.

лирование мишени тетрапуклеотидным реагентом (I) в присутствии эффекторов [7], расщепление полипуклеотидной цепи по остаткам модифицированных пуринов 10% водным ниперидином (100° С, 30 мин) [12], регистрацию и выделение продуктов рестрикции электрофорезом в 8% денатурирующем полиакриламидном геле (рис. 1, 2) [7] проводили как описано в указанных сообщениях. Выход реакции направленной химической рестрикции определяли как отношение радиоактивности в пятне, соответствующем продукту расщепления ДНК-мишени по заданному основанию, к суммарной радиоактивности в дорожке геля. Статистическое расщепление полипуклеотидной цепи по остаткам пуринов (дорожки А+С, рис. 1, 2) получали обработкой препарата ДНК 2% дифениламином в 66% муравьиной кислоте (25° С, 5 мин) [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамеев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогин М. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1475-1478.
2. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамеев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогин М. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240-248.
3. Vlassov V. V., Zarytova V. F., Kutyavin I. V., Mamayev S. V., Podymingogin M. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 10. P. 4065-4076.
4. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Левина А. С., Мамеев С. В., Подыминогин М. А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 1. С. 102-104.
5. Kutyavin I. V., Podymingogin M. A., Bazhina Yu. N., Fedorova O. S., Knorre D. G., Levina A. S., Mamayev S. V., Zarytova V. F. // FEBS Lett. 1988. V. 238. № 1. P. 35-38.
6. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Рук. деп. в ВИНТИ. № 4276-B89 от 29 июня 1989 г.
7. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Мамеев С. В., Подыминогин М. А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 12. С. 1653-1660.
8. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516-521.
9. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1989. Вып. 6. С. 3-9.
10. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911-920.
11. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886-894.
12. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499-560.
13. Коробко В. Г., Грачев С. А. // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1420-1422.

Поступила в редакцию
18.XI.1991

V. F. ZARYTOVA, I. V. KUTYAVIN, S. V. MAMAYEV, M. A. PODYMINOGIN

SITE-SPECIFIC CHEMICAL CLEAVAGE OF A SINGLE-STRANDED DNA FRAGMENT BY AN ALKYLATING DERIVATIVE OF TETRANUCLEOTIDE d(pApGpCpA) IN THE PRESENCE OF TETRANUCLEOTIDE EFFECTORS

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy
of Sciences, Novosibirsk*

Alkylation of a single-stranded DNA 302-mer by a 5'-O-phosphoryl-[4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzyl]amide derivative of the tetradeoxyribonucleotide d(pApGpCpA) in the presence of 3',5'-di-N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives of tetranucleotides as effectors led to specific chemical cleavage of the target at the guanosine residues of the sites ... pTpGppT ... The reagent can be selectively addressed to one of three alkylation sites with the aid of a pair of tetranucleotide effectors flanking the chemically reactive tetranucleotide in the complex with the target DNA. The yield of the cleavage depends on the concentration of both the reagent and effectors, and can be enhanced, if a chain of two or more effectors from each side of the reagent is used. In this case, 3',5'-di-Phn-tetranucleotide effectors are to immediately flank the reagent.