



УДК 547.963.32.057 + 577.164.187

© 1993 А. В. Горожанкин, Е. М. Иванова, Н. Д. Кобец

**СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНОГО ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОТИМИДИЛАТА, СОДЕРЖАЩЕГО АЛКИЛИРУЮЩУЮ ГРУППУ И ОСТАТОК БИОТИНА, ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА***Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения РАН*

Для изучения структуры хроматина с помощью методов специфической (направленной) химической модификации и электронной микроскопии синтезировали производное олигонуклеотида (pT)<sub>16</sub><sup>\*</sup>, содержащее одновременно алкилирующую группу на 5'-конце олигонуклеотида и остаток биотина на 3'-конце. Показано, что такое производное алкилирует ДНК в составе ядер клеток HeLa с той же эффективностью, что и алкилирующее производное олигодезоксириботимицилата, не содержащее остаток биотина. Алкилирование ДНК в составе ядер происходит специфически по расплетенным poly(dA)-участкам ДНК, о чем свидетельствуют данные по ингибированию реакции алкилирования свободным гексадекадезоксириботимицилатом, а также ингибирование алкилирования ДНК в составе ядер, предварительно обработанных S<sub>1</sub>-нуклеазой, расщепляющей одноцепочечные участки ДНК.

Предполагается использование таких производных олигонуклеотидов для исследования распределения зон ДНК, обогащенных соответствующими повторами, расположенными в локально расплетенных участках хроматина, с помощью электронной микроскопии.

Ранее было показано, что алкилирующие производные олигонуклеотидов, комплементарные A<sub>n</sub>- и (TG)<sub>n</sub>-повторам ДНК эукариотических клеток, могут специфически модифицировать ДНК в составе нативного хроматина [1—4].

Визуализируя такие участки ДНК, доступные для направленного воздействия в составе интактных ядер и метафазных хромосом, с помощью стрептавидина [5] в комплексе с коллоидным золотом под электронным микроскопом, можно представить распределение участков ДНК, обогащенных соответствующими повторами, расположенными в локально расплетенных зонах ДНК хроматина.

Для решения этой задачи было синтезировано производное олигонуклеотида, одновременно содержащее алкилирующую группу — остаток 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламина (на 5'-конце олигонуклеотида) и остаток биотина (на 3'-конце олигонуклеотида), и исследована комплементарно адресованная модификация ДНК в составе хроматина клеток HeLa таким производным.

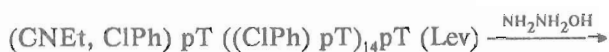
В литературе описано введение биотина в молекулы олигонуклеотида, содержащие алифатическую аминогруппу на 5'-концевом фосфате [6].

Нами синтезировано производное олигонуклеотида, содержащее свободный 5'-фосфат и алифатическую аминогруппу на 3'-концевом фосфате.

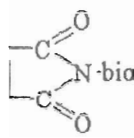
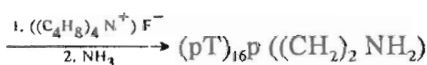
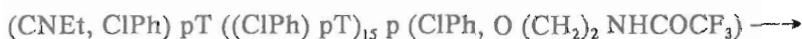
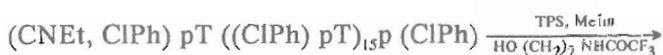
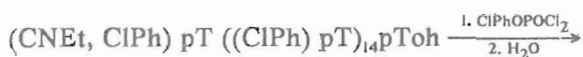
Синтез проводили по схеме, предложенной в работе [7] (см. схему). Полностью защищенный олигонуклеотид (I), полученный в результате фосфотриэфирного синтеза в растворе согласно работе [8], фосфорилировали по 3'-концу, вводили по 3'-концевому фосфату N-защищенный аминокэтанол. Деблокирование олиго-

\* Префикс «d» перед названием дезоксирибонуклеотидов здесь и далее опущен.

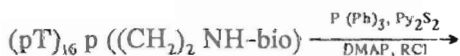
нуклеотида осуществляли обработкой тетрабутиламмонийфторидом и аммиаком [9].



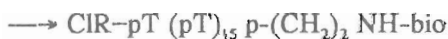
(I)



(II)



(III)



(IV)

(DMAP — диметиламинопиридин, bio — остаток биотина, RCl — 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламин, TPS — триизопропилфенилсульфокислота,  $Py_2S_2$  — 2,2'-дипиридилдисульфид, MeIm — N-метилимидазол).

Остаток биотина вводили в полученный олигонуклеотид (II) с помощью N-оксисукцинимидного эфира биотина, растворенного в DMF [6]. Бiotинилированный олигонуклеотид выделяли обращенно-фазовой хроматографией. Для доказательства наличия остатка биотина в олигонуклеотиде использовали реакцию комплексообразования со стрептавидином [10].

Алкилирующее производное олигонуклеотида (IV) получали по методике [11], вводя олигонуклеотид (III) в реакцию с 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламином в присутствии 2,2'-дипиридилдисульфида ( $Py_2S_2$ ) и  $P(Ph)_3$  в качестве конденсирующих агентов и DMAP (4-N',N'-диметиламинопиридин) в качестве катализатора. Алкилирующее производное олигонуклеотида (IV) выделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Выход составлял 60—70%. Содержание активного хлора (более 90%) в составе олигонуклеотидного производного (IV) определяли по его реакции с  $Na_2S_2O_3$ . Сохранность биотина в алкилирующем производном (IV) была доказана по образованию комплекса со стрептавидином [10].

Далее была исследована способность полученного производного олигонуклеотида (IV) модифицировать ДНК в составе интерфазных ядер HeLa.

Для определения относительной степени модификации ДНК в составе хроматина использовали  $^{32}P$ -меченные производные олигонуклеотидов. Модификацию ДНК проводили при концентрации олигонуклеотида  $10^{-6}$  M в многокомпонентном буфере А (см. «Экспериментальную часть»). Для сравнения относительной степени

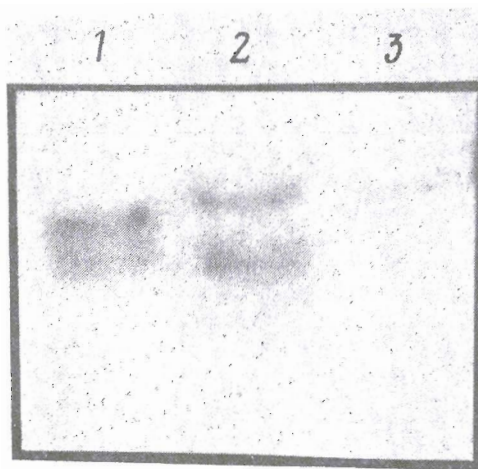


Рис. 1. Радиоавтограф после электрофореза в 1% агарозном геле ДНК, модифицированной в составе хроматина алкилирующими производными олигонуклеотидов CIR-pT(pT)<sub>15</sub>p-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-bio (IV) (1), CIR-pT(pT)<sub>15</sub> (2) и производным (IV) в присутствии (pT)<sub>16</sub> (3)

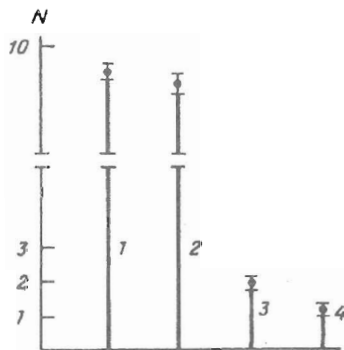


Рис. 2. Относительная степень модификации ( $N$ ) ДНК в составе интактных ядер HeLa алкилирующими производными олигонуклеотидов CIR-pT(pT)<sub>15</sub>p-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-bio (IV) (1), CIR-pT(pT)<sub>15</sub> (2), (IV) в присутствии (pT)<sub>16</sub> (3) и (IV) при предварительной обработке ядер S<sub>1</sub>-нуклеазой (4).  $N$  выражена в молях реагента на 10<sup>7</sup> моль нуклеотидов ДНК

модификации ДНК в составе хроматина в тех же условиях использовали олигонуклеотид без биотинового остатка, содержащий лишь группу RCl. Относительную степень модификации ДНК в составе интактных ядер определяли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-100 в денатурирующих условиях (7 М мочевины) и электрофорезом на 1% агарозе.

Как видно из данных анализа модифицированной ДНК (рис. 1), введение остатка биотина на 3'-конец алкилирующего производного олигонуклеотида не влияет на его реакционную способность. Эффективность модификации ДНК приблизительно одинакова в обоих случаях.

Для доказательства специфичности модификации ДНК в составе хроматина биотинилированным производным олигонуклеотида (IV) по poly(A)-трактам ДНК проводили модификацию в присутствии избытка немодифицированного гексадекатимидилата (рис. 2). В присутствии свободного олигонуклеотида (pT)<sub>16</sub>, конкурирующего за место комплементарного связывания с ДНК, наблюдалось отчетливое ингибирование реакции.

Резкое снижение относительной степени модификации ДНК в составе хро-

матина ядер, предварительно обработанных  $S_1$ -нуклеазой в мягких условиях [12] (когда расщепляются только доступные одноцепочечные участки ДНК хроматина без нарушения общей морфологии ядра), позволяет заключить, что наблюдаемая специфическая модификация ДНК в составе хроматина протекает по poly(A)-трактам, расположенным в зонах локального расплетения ДНК.

Данные результаты показывают, что алкилирующее производное биотинилированного олигонуклеотида (IV) может быть использовано для направленной на определенные участки ДНК химической модификации в составе хроматина. Остаток биотина в составе олигонуклеотидного производного, по-видимому, позволяет визуализировать эти зоны в составе нативных ядер под электронным микроскопом с помощью комплекса стрептавидин — коллоидное золото.

Авторы выражают благодарность Т. С. Годовиковой за помощь в обсуждении работы, Е. Л. Черноловской, Р. Г. Борисову за помощь в экспериментальной работе, В. В. Власову, В. Ф. Куликовой за содействие в работе.

### Экспериментальная часть

В работе использовали  $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$  (ХПО «Радиопрепарат», Ташкент), T4-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент», Вильнюс), рибонуклеазу А (Calbiochem, США).

Олигонуклеотид выделяли ВЭЖХ с помощью хроматографа Altex-332 (США) на колонках размером  $10 \times 250$  мм. В качестве носителя для обращенно-фазовой хроматографии использовали LiChrosorb RP-18 (Merck, ФРГ), для ионообменной — полисил СА (НПО «Вектор», Бердск). Хроматографию на полисиле СА проводили в  $0\text{--}0,3$  М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0\text{--}30\%$  ацетонитрила, на LiChrosorb RP-18 — в  $0\text{--}20\%$  ацетонитрила,  $0,05$  М  $\text{LiClO}_4$ .

Защищенный дезоксирибонуклеотид  $(\text{pT})_{15}$  (I) любезно предоставлен Т. В. Абрамовой (НИБХ СО РАН). Получение защищенного аминопроизводного олигонуклеотида проводили по методике [7].

Защитные группы триэфиролigonуклеотидных блоков удаляли по методике [9].

Продукты реакции выделяли при помощи ВЭЖХ.

Получение биотинилированного олигонуклеотида (IV) [6]. К  $50$   $\text{OE}_{260}$  олигонуклеотида (II) в  $40$  мкл  $0,2$  М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  добавляли  $10$ -кратный избыток ( $3,8$  мг) N-оксисукцинимидного эфира биотина, растворенного в  $80$  мкл DMF, и выдерживали  $3,5$  ч при  $20^\circ\text{C}$ . Олигонуклеотидный материал осаждали  $2\%$  раствором  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне и выделяли продукт с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Содержание биотина в олигонуклеотидном производном (III) определяли по образованию комплекса биотинилированного олигонуклеотида со стрептавидином [10]. Выход биотинилированного олигонуклеотида (III) составлял  $90\%$ .

Алкилирующее производное биотинилированного олигонуклеотида (IV) синтезировали в соответствии с работой [11]. Производное (IV) выделяли с помощью ВЭЖХ на LiChrosorb RP-18.

Количество активного хлора в производном (IV) определяли реакцией с  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $2$  М раствор). Реакционную смесь выдерживали  $18$  ч при  $37^\circ\text{C}$ . По окончании реакции смесь анализировали при помощи ионообменной хроматографии на полисиле СА. Содержание активного хлора составляло более  $90\%$ .  $^{32}\text{P}$ -радиоактивную метку в олигонуклеотид по  $5'$ -концу (далее обозначена р) вводили ферментативно по методу [13] перед получением алкилирующего производного (IV).

Ядра из клеток HeLa выделяли по методике [14].

Интактные ядра алкилировали  $5'$ -фосфамидными производными CIR-pT  $(\text{pT})_{15}$ -p-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ NH-bio (IV) и CIR-pT  $(\text{pT})_{15}$  в буфере А ( $15$  мМ трис-HCl, pH  $7,5$ ;  $0,34$  М сахароза,  $4$  мМ EDTA,  $60$  мМ KCl,  $15$  мМ NaCl,  $4$  мМ  $\text{CaCl}_2$ ,  $0,15$  мМ спермин,  $0,5$  мМ спермидин,  $0,1$  мМ фенилметилсульфонилфторид).

Реакционную смесь инкубировали 18—20 ч при 25° С (концентрация реагента ~ 10<sup>-6</sup> М). По окончании инкубации выделяли модифицированную ДНК методом фенольной депротеинизации при рН 8,3 в присутствии 0,5% SDS после расщепления протеинкиназой К и РНК-азой А, как описано в работе [4].

Для определения степени модификации ДНК отделяли от непрореагировавшего олигонуклеотида гель-фильтрацией на сефадексе G-100 в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Гель-электрофорез модифицированной ДНК проводили в 1% агарозном геле при напряжении ~ 200 В в буферном растворе (0,05 М трис-НСl, рН 8,4; 0,05 М борат калия, 1 мМ EDTA). Агарозный гель по окончании электрофореза окрашивали этидийбромидом, высушивали и радиоавтографировали.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В. В., Иванова Е. М., Кобец Н. Д., Мамаев С. В., Шульженко С. Г., Якубов Л. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. № 1. С. 196—199.
2. Беляев Н. Д., Власов В. В., Кобец Н. Д., Иванова Е. М., Якубов Л. А. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 1. С. 234—236.
3. Власов В. В., Кобец Н. Д., Черноловская Е. Л., Иванова Е. М., Субботин В. Н., Якубов Л. А. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
4. Vlassov V. V., Kobetz N. D., Chernolovskaya E. L., Demidova S. G., Borissov R. G., Ivanova E. M. // Mol. Biol. Repts. 1990. V. 14. № 1. P. 11—15.
5. Menissier J., Hunting D. J., Muzca G. // *Analyt. Biochem.* 1985. V. 148. P. 339—343.
6. Agarwal S., Christodoulou C., Gait M. J. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 15. P. 6227—6245.
7. Бенимецкая Л. З., Бульчев Н. В., Горн В. В., Козионов А. Л., Кутявин И. В., Лебедев А. В., Новожилов С. Ю., Подыминогин М. А., Штокман М. И. // Препринт № 252. Новосибирск, ИЭиА, 1984.
8. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
9. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 815—820.
10. Green N. M. // *Meth. Enzymol.* 1970. V. 18. Part A. P. 418—434.
11. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. И. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886—893.
12. Sheffery M., Marks P. A., Rifkind B. A. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 172. P. 417—436.
13. Berkner K. L., Folk W. R. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3176—3183.
14. Price R., Penman S. // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 70. P. 435.

Поступила в редакцию  
8.IV.1992

A. V. GORODZANKIN, E. M. IVANOVA, N. D. KOBETS

### THE SYNTHESIS OF AN OLIGOTHYMYDYLATE DERIVATIVE BEARING AN ALKYLATING GROUP AND BIOTIN FOR SEQUENCE-SPECIFIC CHEMICAL MODIFICATION OF CHROMATIN

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

An oligodeoxythymidylate derivative bearing an alkylating group at the 5'-end and biotin at the 3'-end (RCl-(pdT)<sub>16</sub>-bio) was synthesized. This reagent alkylates polyA-tracts of DNA in HeLa nuclei specifically via complementary complexes with single-stranded segments of DNA and by the preliminary treatment of chromatin with S<sub>1</sub>-nuclease, since the reaction is inhibited by an excess of the corresponding free oligothymidylate.

The reagent will be used to study the distribution of local unwinded parts of polyA-repeats of DNA in human chromatin by the electron microscopy.