



УДК 577.113.4+615.779.9:543.422.25

КАТАЛИТИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК-МИШЕНИ БЛЕОМИЦИНОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА В СОСТАВЕ КОМПЛЕМЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА

© 1995 г. Д. С. Сергеев*, Т. С. Годовикова, В. Ф. Зарытова

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8*

Поступила в редакцию 03.08.94 г.

Впервые на основе олигонуклеотидов созданы реагенты, способные осуществлять сайт-специфические разрывы ДНК в каталитическом режиме. Продемонстрирована способность одной молекулы реагента $(\text{Blm-R})\text{pd}(\text{ССАААСА})$, содержащего остаток блеомицина A_5 (Blm-RH), деградировать три молекулы ДНК-мишени $\text{pd}(\text{TGTTTGGCGAAGGA})$. Показано, что каталитическая активность реагента наиболее полно проявляется в температурном интервале, близком к температуре плавления комплекса реагент · ДНК-мишень. Число молекул мишени, подвергшихся воздействию блеомицинового реагента, ограничено разрушением самого остатка антибиотика в ходе окислительной деструкции ДНК-мишени. В условиях эквимольного соотношения реагента и ДНК-мишени каталитическая активность реагента проявляется в последовательной деградации мишени по остаткам G^7 , T^5 , T^4 и T^3 . В случае 10-кратного избытка мишени по отношению к реагенту регистрируется ее деградация на 30% в основном по единственному положению – G^7 .

Ключевые слова: каталитическое расщепление ДНК, реакционноспособные производные олигонуклеотидов, блеомицин.

В настоящее время активно ведутся работы по созданию терапевтических средств ген-направленного действия на основе олигонуклеотидов. Такие соединения обладают аффинностью к определенному участку ДНК-мишени и способны сайт-специфически воздействовать на эту молекулу [1]. Эффективность воздействия на НК-мишень определяется способностью олигонуклеотидной части реагента образовывать комплементарные комплексы с мишенью и реакционной способностью введенной в олигонуклеотид группировки. Среди широкого круга используемых реакционноспособных группировок большое внимание уделено группировкам, хелатирующим переходные металлы, таким, как Fe(III)-EDTA , $\text{Cu(II)-фенантролин}$, металлопорфирины [2 - 4]. В присутствии окислителей они способны генерировать активные кислородсодержащие частицы в каталитическом режиме [5 - 7]. Генерируя OH^\cdot -радикалы (Fe(III)-EDTA [6, 8]) или образуя высоковалентные оксокомплексы (металлопорфирины [9]) в непосредственной близости от ДНК, эти соединения могут индуцировать повреждение

оснований или сахарофосфатного скелета [2 - 8], причем, как правило, превалирует повреждение оснований с образованием щелочелавильных продуктов [7, 10, 11].

Наиболее перспективными могут оказаться группировки, способные преимущественно осуществлять не повреждение оснований, а прямую деградацию рибозофосфатного скелета ДНК. К таким группировкам "прямого" повреждающего действия относится природный противоопухолевый антибиотик блеомицин [12, 13], способный осуществлять одно- и двухцепочечные разрывы ДНК [14 - 16]. Повреждение оснований свободным блеомицином является минорной реакцией [17]. Механизм эффективной деградации ДНК антибиотиком включает в себя специфическое связывание молекулы антибиотика с ДНК, хелатирование иона двухвалентного железа в активном центре с последующим взаимодействием Fe(II) с молекулярным кислородом и селективным окислением четвертого углеродного атома дезоксирибозы, приводящим к деструкции сахарофосфатного остова ДНК [18 - 20].

Не образуя ковалентных связей с ДНК после акта окисления дезоксирибозы, блеомицин способен

Сокращения: Blm-RH – блеомицин A_5 .

* Автор для переписки.

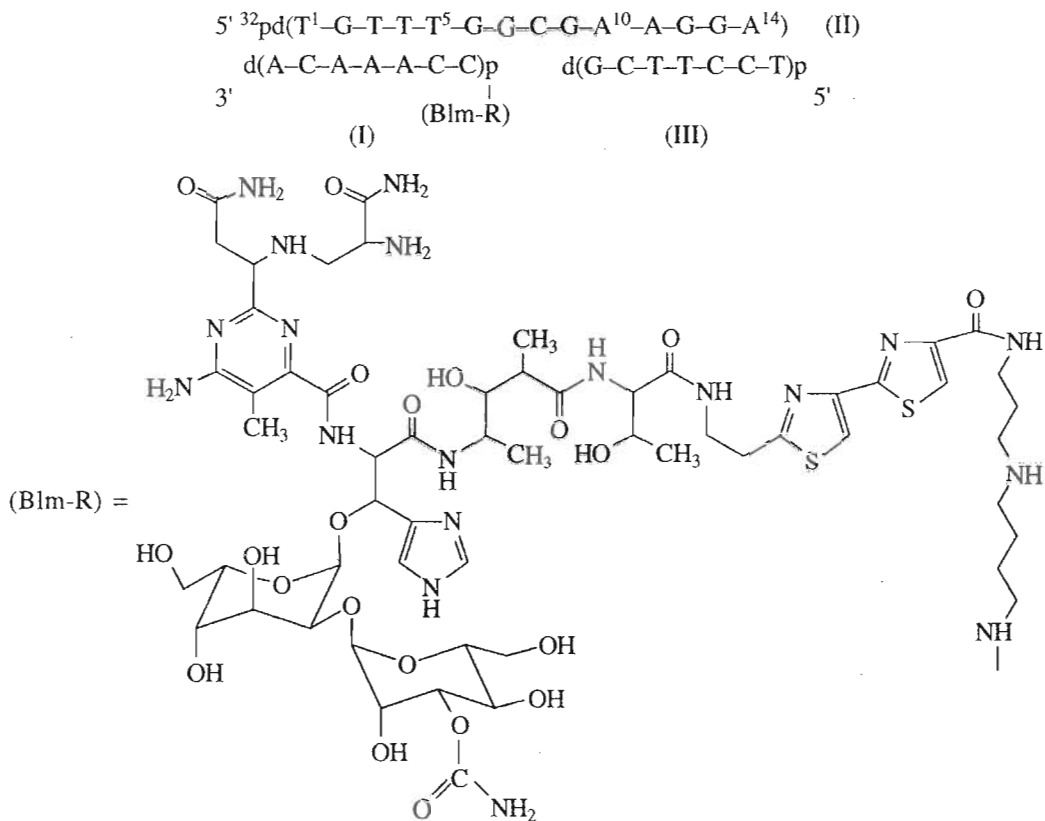


Рис. 1. Модельная система, используемая для расщепления ДНК-мишени.

связываться с новым участком ДНК и после восстановления иона железа в активном центре снова осуществлять окисление сахарофосфатного остова. На протяженных ДНК было обнаружено, что одна молекула антибиотика вызывает образование нескольких молекул свободных гетероциклических оснований или пропеналей оснований [21]. Способность одной молекулы блеомицина degradировать несколько молекул ДНК была показана при использовании в качестве мишеней олигонуклеотидов [22]. Таким образом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что блеомициновые производные олигонуклеотидов могут оказаться одними из наиболее перспективных реагентов для сайт-специфического воздействия на ДНК-мишень.

Ранее [23] нами был предложен метод получения производного олигонуклеотида, несущего ковалентно присоединенный остаток блеомицина A_5 . Было показано, что в таком конъюгате антибиотик сохраняет способность эффективно degradировать ДНК-мишень. Однако возможность каталитического расщепления ДНК, характерная для всех группировок окислительно-восстановительного механизма действия, после введения последних в олигонуклеотид до сих пор не была реализована [2 - 4].

В данной работе представлены результаты, свидетельствующие о том, что блеомицин, ковалентно связанный с олигонуклеотидом, сохраняет способность degradировать ДНК в каталитическом режиме*.

Исследование способности остатка блеомицина в составе олигонуклеотидного конъюгата каталитически расщеплять комплементарную ДНК проводили на модели, представленной на рис. 1.

Каталитическая активность остатка блеомицина, ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду, может выразиться (в зависимости от условий) в повреждении нескольких молекул ДНК-мишени одной молекулой реагента или в неоднократном воздействии на одну и ту же мишень из комплементарного комплекса. Для выявления каталитической активности блеомицинового производного олигонуклеотида при расщеплении ДНК-мишени проводились эксперименты, в которых концентрация реагента (I) была в 10 раз меньше по отношению к концентрации мишени (II) и гептануклеотида (III), добавленного в систему для имитации образования двойной спирали (рис. 1). Обнаружено, что в данных условиях около 20% мишени претерпевает прямое расщепление (рис. 2а) и еще 10% образовавшихся щелчелабильных

* Краткое сообщение опубликовано в работе [24].

сайтов могут быть выявлены дополнительной обработкой пиперидином (рис. 2б). При этом распределение продуктов расщепления в экспериментах, результаты которых представлены на рис. 2а, 2б, совпадает и отличается от распределения продуктов расщепления свободным антибиотиком (рис. 2в). Если олигонуклеотидный реагент расщепляет мишень преимущественно по единственному сайту G⁷ (60 - 70%), то расщепление блеомицином более равномерно распределяется по нескольким сайтам с преобладающим расщеплением по остатку С⁸ (рис. 2). Низкая степень расщепления свободным блеомицином (10%) по сравнению с олигонуклеотидным реагентом может быть обусловлена более слабым связыванием антибиотика с ДНК-мишенью в данных условиях.

Для проявления каталитической активности при деградации ДНК как свободному блеомицину, так и блеомициновому производному олигонуклеотида необходимы переходы с одной молекулы мишени на другую. В случае олигонуклеотидного реагента эти переходы связаны с диссоциацией комплементарного комплекса. На рис. 3 представлены результаты расщепления тетрадекануклеотида (II) реагентом (I) при разных температурах. Максимальная степень расщепления мишени наблюдается в интервале 25 - 35°C, который включает в себя температуру плавления комплекса реагент · мишень (около 32°C) [23]. Повышение температуры резко снижает степень расщепления, что, вероятно, связано с уменьшением концентрации комплементарного комплекса реагент · мишень (рис. 3). Понижение температуры также приводит к меньшей степени расщепления мишени, что, возможно, объясняется неоптимальными условиями для проявления каталитической активности реагента, например трудностью перехода реагента на другую молекулу мишени.

Известно, что при окислении комплекса Fe(II)-блеомицин кислородом в отсутствие ДНК часть молекул антибиотика инактивируется и в дальнейшем теряет способность индуцировать разрывы ДНК [19, 25]. Добавление ДНК ингибирует процесс инактивации, поскольку активные кислородные частицы, образующиеся при окислении железа в металлсвязывающем центре блеомицина, расходятся на окисление ДНК. Однако даже при большом избытке двухвалентного железа и восстанавливающих агентов и в присутствии ДНК число актов окислительной деструкции ДНК ограничено. Так, отношение суммы свободных оснований тимина и цитозина и их пропеналей, выделившихся в результате расщепления протяженных ДНК блеомицином, к антибиотику составляло 2.4 - 2.6 [21], а в случае расщепления олигонуклеотидов - 3 - 10 [22]. Деградация около 30% тетрадекануклеотида (II) олигонуклеотидным реагентом (I) в условиях 10-кратного избыт-

Распределение продуктов расщепления, %

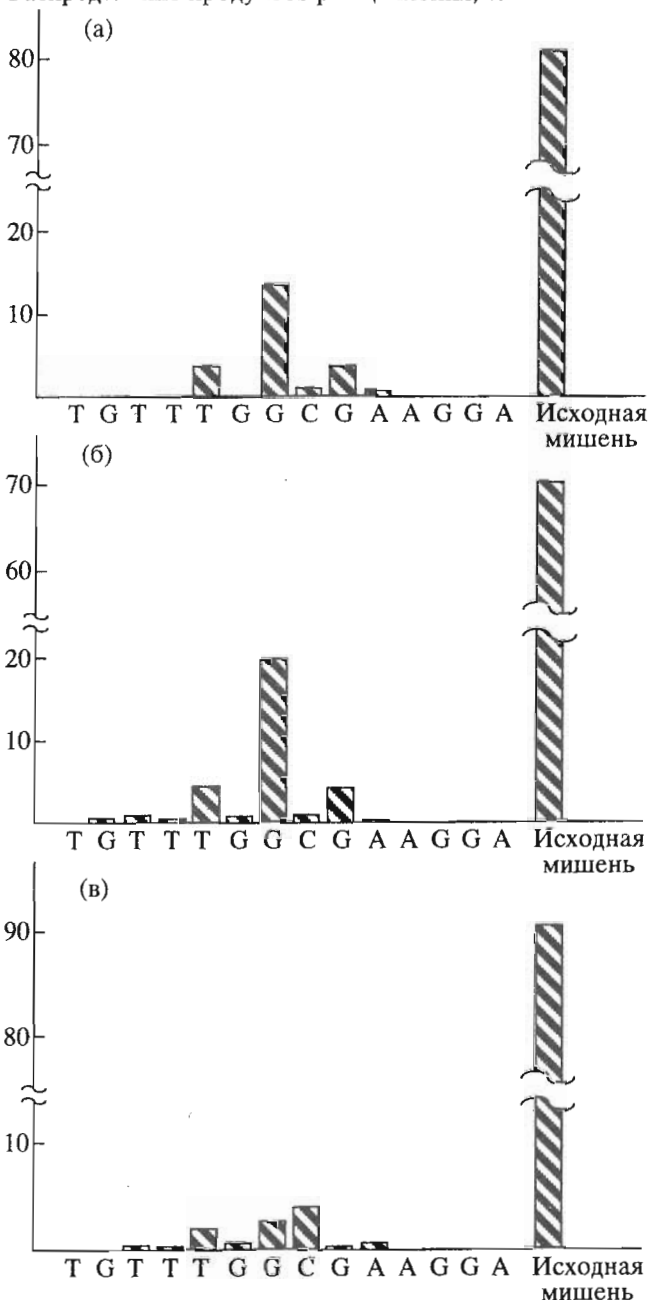


Рис. 2 Денситограммы электрофоретического разделения продуктов расщепления ДНК-мишени (II) в присутствии гептануклеотида (III) реагентом (I) (а, б) или свободным блеомицином в присутствии $pd(CCAAACA)$ (в) в течение 6 ч при 25°C без обработки пиперидином (а) и с пиперидиновой обработкой (95°C, 30 мин) (б, в). Концентрация (II) и (III) 1×10^{-5} М; (I), Blm-RH и $pd(CCAAACA)$ 1×10^{-6} М. Положение столбца соответствует месту расщепления.

ка мишени свидетельствует о том, что одна молекула реагента способна атаковать в среднем три молекулы мишени. Ограничение эффективности действия реагента (I) при наличии достаточного количества ионов железа, восстанавливающего

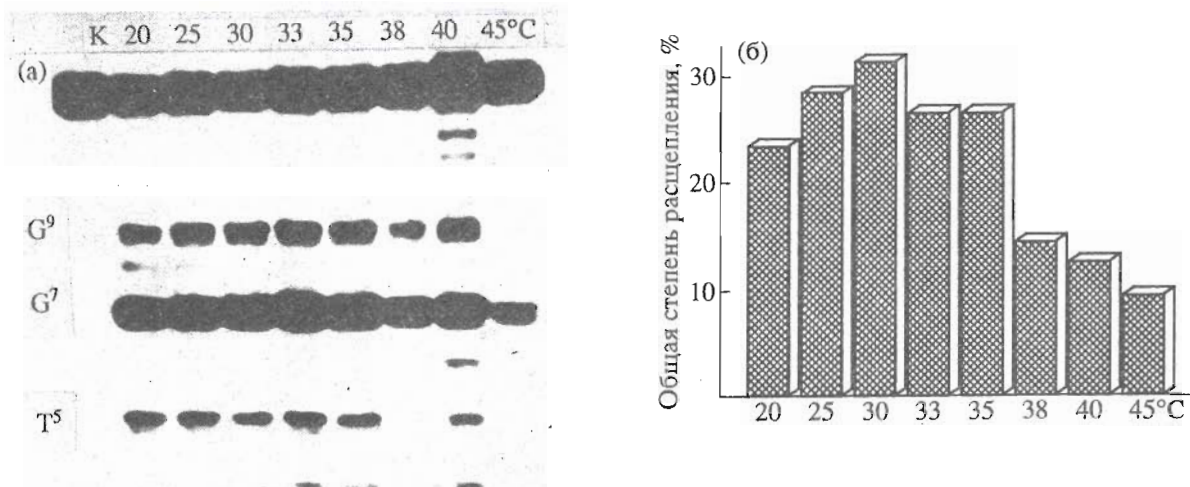


Рис. 3. Результаты деструкции ДНК-мишени (II) (1×10^{-5} М) реагентом (I) (1×10^{-6} М) в присутствии гептануклеотида (III) (1×10^{-5} М) при разных температурах по данным электрофоретического анализа. а – электрофореграмма, б – результат ее обсчета. Время реакции 6 ч. К – мишень без реагента в условиях реакции при 45°C.

агента и молекулярного кислорода может быть связано с деградацией или его олигонуклеотидной части, или самого остатка антибиотика. В предыдущей работе [23] было предварительно показано, что в условиях эффективной деградации мишени (II) при эквимольном соотношении реагент–мишень олигонуклеотидная часть реагента остается немодифицированной. Результаты аналогичного эксперимента в условиях 10-кратного избытка мишени (II) с использованием $5'$ - ^{32}P -меченого реагента (I) представлены на рис. 4. По появлению продуктов (дорожки 3, 4), имеющих бóльшую электрофоретическую подвижность, чем исходный реагент (I) (дорожка 2), можно заключить, что в условиях каталитической деградации мишени (II) существенно разрушается сам реагент как в присутствии ДНК-мишени (дорожка 4), так и в ее отсутствие (дорожка 3). При выдерживании реакционной смеси после проведения реакции в условиях гидролиза фосфамидной связи (рН 3.5, 37°C, 16 ч) между остатком антибиотика и олигонуклеотидом в реагенте (I) образуется интактный $5'$ -меченый гептануклеотид (дорожка 5). Дополнительная пиперидиновая обработка последнего не приводит к какой-либо деградации (дорожка 6). Таким образом, ограничение каталитической активности реагента (I) связано, по-видимому, с деструкцией самого остатка антибиотика.

Воздействие блеомицинового производного олигонуклеотида (I) на тетрадекануклеотид (II) в условиях их эквимольного отношения вызывает практически полную деградацию мишени [23]. При этом образуются широкий спектр продуктов расщепления (по остаткам G^7 , T^5 – T^3) и модифицируются сайты (T^5 – T^3), находящиеся довольно далеко от места ковалентного присоединения антибиотика (см. модель на рис. 1). В то же время

модификация в условиях 10-кратного избытка мишени идет преимущественно по G^7 (рис. 2а). Данный факт можно объяснить исходя из каталитических свойств остатка антибиотика, которые в условиях эквимольного отношения реагент – мишень могут выразиться в неоднократном воздействии на ДНК-мишень.

Изучение временной зависимости деградации тетрадекануклеотида (II) при 20°C показало, что в первую очередь атакуется G^7 -положение мишени (рис. 5). Далее происходит накопление более коротких фрагментов мишени, образующихся при деструкции сайтов T^5 и T^4 , T^3 . При этом продукт расщепления по положению G^7 перестает накапливаться и со временем его количество начинает уменьшаться (рис. 5). Аналогичные превращения претерпевает продукт расщепления по положению G^9 . Таким образом, как при избытке мишени, так и при эквимольном соотношении реагент – мишень первой атаке остатком антибиотика подвергается положение G^7 . Но при избытке мишени следующей атаке подвергается интактная мишень, а при эквимольном соотношении реагент – мишень следующая атака, по-видимому, протекает в составе уже модифицированного комплекса.

Расщепление реагентом (I) по сайтам T^5 – T^3 , удаленным от места присоединения остатка антибиотика, протекает в составе комплементарного комплекса. Это подтверждают данные экспериментов, представленных на рис. 6а, 6б. Добавление в реакционную смесь двухцепочечной ДНК должно ингибировать расщепление мишени, которое осуществляется без участия уотсон-криковского спаривания. Однако распределение продуктов расщепления и временной характер деградации тетрадекануклеотида (II) в присутствии

10-кратного избытка двухцепочечной плазмидной ДНК (в пересчете на нуклеотид) не меняется (ср. рис. 5 и ба).

В пользу предположения о том, что эффективная деградация ДНК-мишени протекает только в составе комплементарного комплекса, свидетельствуют данные временной зависимости деструкции тетрадекануклеотида (II) в условиях эквимольного отношения реагент – мишень при 37°C (рис. 6б). При этой температуре происходит лишь атака реагентом (I) по положению G⁷. Получающиеся в результате этого продукты не могут образовать прочного комплементарного комплекса с реагентом при 37°C, и дальнейшая деградация прекращается. Поскольку данная температура превышает температуру плавления комплекса реагента с интактной мишенью, общая степень расщепления мишени также падает (рис. 6б).

Следовательно, наблюдаемая разница в распределении продуктов расщепления при избытке матрицы и при эквимольном соотношении обусловлена свойством остатка блеомицина неоднократно воздействовать на мишень.

Таким образом, остаток блеомицина A₅, ковалентно присоединенный к олигонуклеотиду, сохраняет свойственную свободному антибиотику способность к каталитическому типу действия. В результате впервые созданы реагенты на основе олигонуклеотидов, способные деструктурировать комплементарную ДНК-мишень в каталитическом режиме.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали олигонуклеотиды pd(CCAAACA), pd(TGTTTGGCGAAGGA) и pd(TCCTTCG), синтезированные модифицированным фосфотриэфирным методом [26], гидрохлорид блеомицина A₅ (производство опытного завода органического синтеза ИОС, Латвия). Синтез и свойства блеомицинового производного гептануклеотида (Blm-R)-pd(CCAAACA) описаны ранее [23].

³²P-Меченые олигонуклеотиды получали по методике [27], используя [γ-³²P]АТФ (3000 Ки/ммоль) и полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) в присутствии АДФ.

Концентрации олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения (M⁻¹ см⁻¹): 140000 для (II), 57000 для (III) (вычислены по методике [28]); 66000 для гептануклеотида pd(CCAAACA) (определен ранее методом полного фосфодиэстеразного гидролиза [29]); 81000 для блеомицинового производного (I) этого

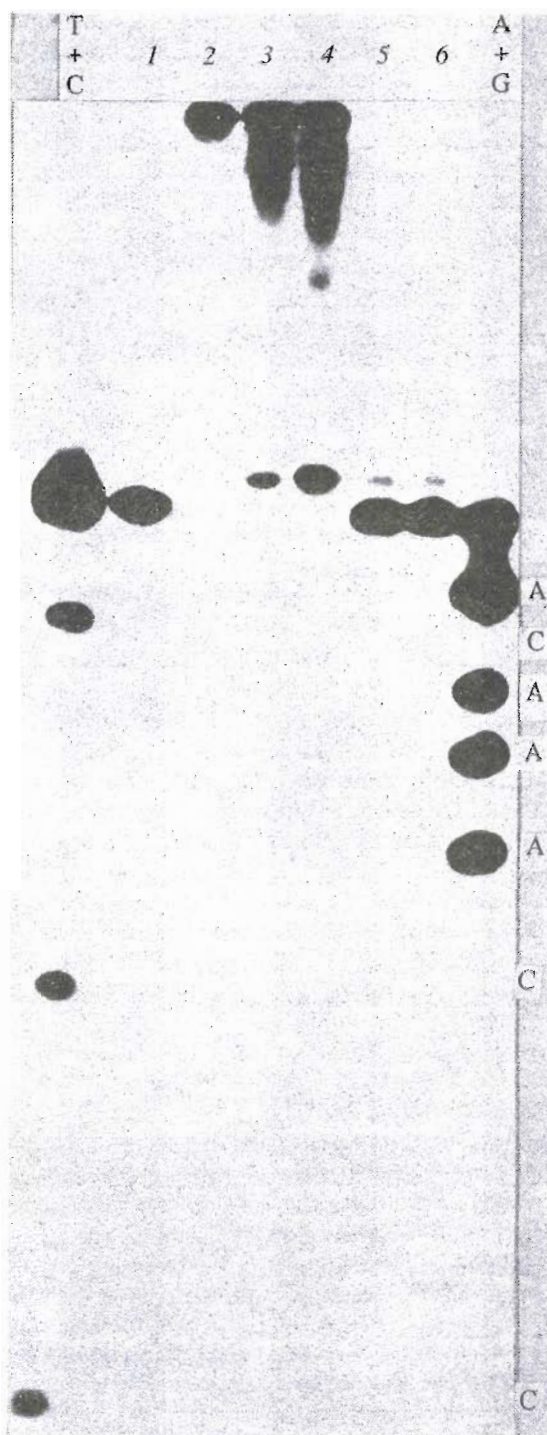


Рис. 4. Электрофоретический анализ 5'-³²P-меченого реагента (I) после деградации им ДНК-мишени (II) (20°C, 6 ч) при концентрациях (I) 1×10^{-6} М, (II) и (III) по 1×10^{-5} М. Дорожка 1 – гептануклеотид ³²pd(CCAAACA); 2 – реагент (I); 3 – реагент (I) после выдерживания в условиях реакции без ДНК-мишени; 4 – реагент (I) после деградации (II); 5 – кислотный гидролиз реагента (I) после деградации ДНК-мишени (II); 6 – то же, но с последующей обработкой пиперидином (95°C, 30 мин). Т + С и А + G – статистическое расщепление цепи ³²pd(CCAAACA) по остаткам пиримидинов и пуринов соответственно.

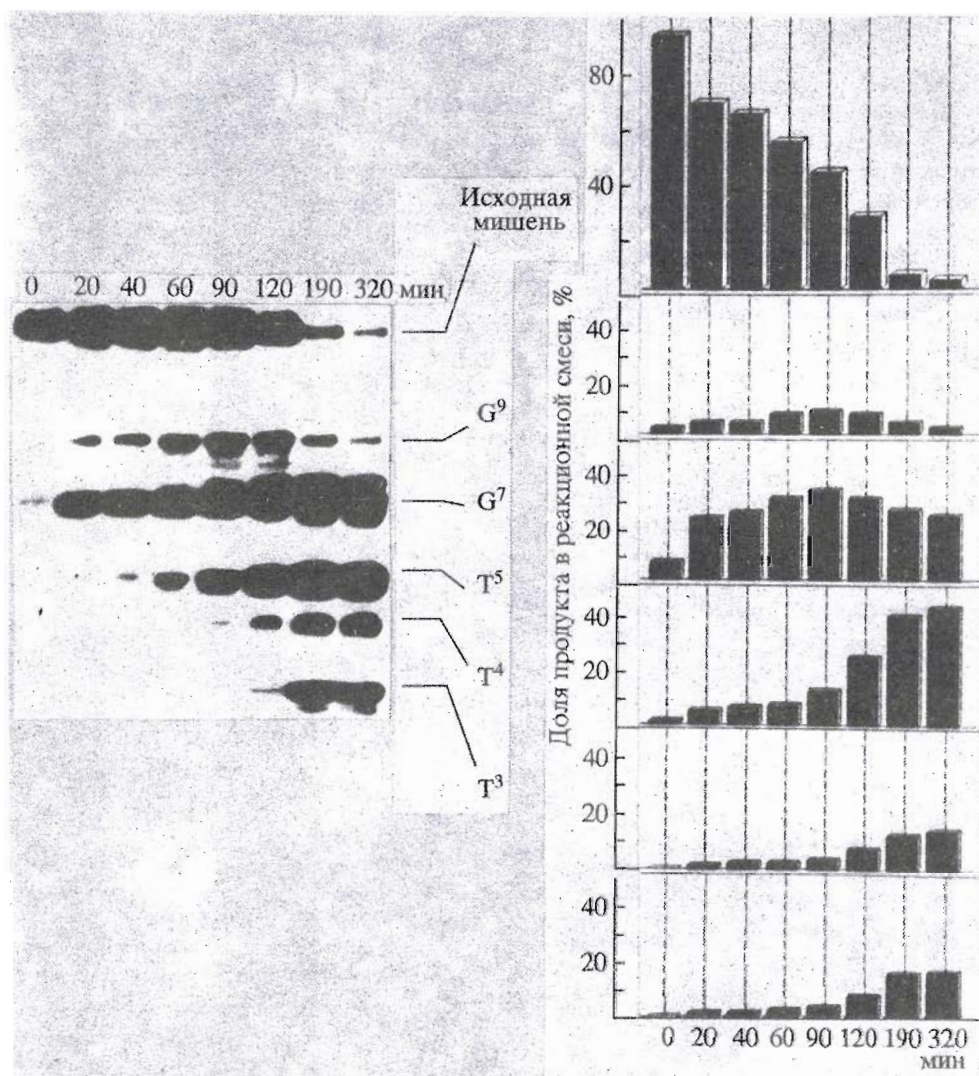


Рис. 5. Зависимость деградации ДНК-мишени (II) реагентом (I) в присутствии гептануклеотида (III) от времени в условиях эквимольного (по 1×10^{-5} М) соотношения всех компонентов при 20°C по данным электрофоретического и денситометрического анализа. Денситограммы описывают временную зависимость доли исходной ДНК-мишени и продуктов ее деградации в реакционной смеси.

гептануклеотида (определен методом радиоизотопной метки [29]).

Электрофоретическое разделение продуктов расщепления проводили в 20% ПААГ в денатурирующих условиях (8 М мочевины, 40°C). Результаты анализа визуализировали радиоавтографией на пленку РМ-В при -20°C .

Деградация ДНК-мишени при отношении реагент – мишень 1 : 10. Реакционные смеси объемом 20 мкл, содержащие 1×10^{-5} М 5^{1-32}P -меченую ДНК-мишень (II), 1×10^{-5} М гептануклеотид (III) и 1×10^{-6} М реагент (I) в буферном растворе (0.2 М LiCl, 0.01 М трис-HCl, pH 7.5) в присутствии 1×10^{-4} М ионов Fe(II) и 0.05 М 2-меркаптоэтанола, инкубировали 6 ч в пробирке объемом 1.5 мл при заданной температуре. В контрольном экспе-

рименте реагент (I) был заменен на исходный гептануклеотид pd(CCAAACA). После реакции нуклеотидный материал осаждали раствором 2% LiClO₄ в ацетоне, обрабатывали 10% пиперидином (95°C , 30 мин) и анализировали гель-электрофорезом. Степень деградации тетрадекануклеотида (II) определяли, вырезая после радиоавтографии кусочки геля с радиоактивным материалом и просчитывая их в воде по Черенкову на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta (Wallac Oy, Финляндия). Общая степень деградации (рис. 2) дана с учетом фонового расщепления мишени, обусловленного действием ионов Fe(II), кислорода и пиперидиновой обработки. Суммарная ошибка определения степени деградации с учетом неточности определения молярных коэффициентов поглощения, величины оптического

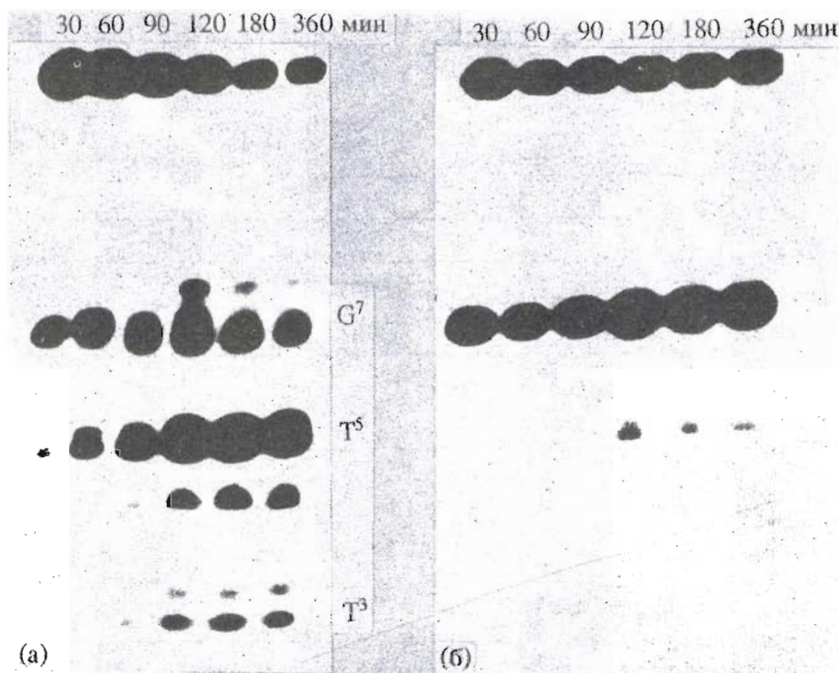


Рис. 6. Электрофоретический и денситометрический анализ продуктов деградации ДНК-мишени (II) реагентом (I) в присутствии гептануклеотида (III) во времени в условиях эквимольного (по 1×10^{-5} М) соотношения всех компонентов при 20°C (а) и 37°C (б). Деградация при 20°C проведена в присутствии 10-кратного избытка (по отношению к ДНК-мишени в пересчете на нуклеотид) двухцепочечной плазмидной ДНК.

поглощения растворов, отбора аликвот и измерением радиоактивности не превышает 25%.

За превращениями реагента (I) при деградации ДНК-мишени (II) в условиях 10-кратного избытка последней следили по данным электрофоретического анализа, используя $5'$ - ^{32}P -меченый реагент, полученный согласно [23]. Остаток антибиотика после реакции отщепляли от олигонуклеотида посредством гидролиза фосфамидной связи в кислых условиях (рН 3.5, 37°C, 16 ч).

Деградация ДНК-мишени при отношении реагент – мишень 1 : 1. Реакционные смеси объемом 60 мкл, содержащие по 1×10^{-5} моль/л реагентов (I) - (III) в буферном растворе (0.2 М LiCl, 0.01 М трис-HCl, рН 7.5, 0.05 М 2-меркаптоэтанол), инкубировали при 20°C (рис. 5), 37°C (рис. 6б) и 20°C в присутствии 10-кратного избытка (по отношению к ДНК-мишени в пересчете на нуклеотид) двухцепочечной плазмидной ДНК (рис. 6а). Реакцию инициировали добавлением раствора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ до концентрации 1×10^{-4} М, свежеприготовленного из дегазированной аргоном воды. Через определенные промежутки времени из реакционных смесей отбирали аликвоты по 6 мкл, реакцию останавливали добавлением EDTA до концентрации 1 мМ, осаждали олигонуклеотидный материал 2% LiClO_4 в ацетоне, обрабаты-

вали 10% пиперидином (95°C, 30 мин) и анализировали гель-электрофорезом. Количественный анализ радиоавтографа (рис. 5) проводили на лазерном денситометре Ultrascan XL (LKB).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V. // Sov. Sci. Rev. B. Chem. 1989. V. 12. P. 271 - 339.
2. Boutorin A.S., Vlassov V.V., Kazakov S.A., Kutuyavin I.V., Podyminogin M.A. // FEBS Lett. 1984. V. 172. № 1. P. 43 - 46.
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. Basile L.A., Barton J.K. // Metal Ions in Biological System. V. 25 / Eds H. Sigel, A. Sigel. N.Y.: Marcel Dekker, 1989. P. 31 - 103.
6. Hertzberg P., Dervan P.B. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 17. P. 3934 - 3945.
7. Van Atta R.B., Bernadou J., Meunier B., Hecht S.M. // Biochemistry. 1990. V. 29. № 20. P. 4783 - 4789.
8. Tullius T.D., Dombroski B.A. // Science. 1985. V. 230. № 4726. P. 679 - 681.
9. Bill E., Ding X.-Q., Bominaar E.L., Trautwein A.X., Winkler H., Mandon D., Weiss R., Gold A., Jayaraj K., Hatfield W.E., Kirk M.L. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 188. № 3. P. 665 - 672.

10. *Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 34. P. 20509 - 20512.
11. *Dizdaroglu M., Aruoma O.I., Halliwell B.* // *Biochemistry.* 1990. V. 29. № 36. P. 8447 - 8451.
12. *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects* / Ed. S.M. Hecht. N.Y.: Springer-Verlag, 1979.
13. *Hecht S.M.* // *Acc. Chem. Res.* 1986. V. 19. № 12. P. 383 - 391.
14. *Suzuki H., Nagai K., Yamaki H., Tanaka N., Umezawa H.* // *J. Antibiot.* 1969. V. 22. № 6. P. 446 - 448.
15. *Povirk L.F.* // *Molecular Aspects of Anti-cancer Drug Action.* / Eds S. Neidle, M. Warign. L.: Macmillan, 1983. P. 157 - 181.
16. *Steighner R.J., Povirk L.F.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 11. P. 8350 - 8354.
17. *Gajewski E., Aruoma O.I., Dizdaroglu M., Halliwell B.* // *Biochemistry.* 1991. V. 30. № 9. P. 2444 - 2448.
18. *Burger R.M., Peisach J., Horwitz S.B.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 24. P. 11832 - 11838.
19. *Stubbe J., Kozarich J.W.* // *Chem. Rev.* 1987. V. 87. № 5. P. 1107 - 1136.
20. *Petering D.H., Byrnes R.W., Antholine W.E.* // *Chem.-Biol. Interact.* 1990. V. 73. № 2. P. 133 - 182.
21. *Povirk L.F.* // *Biochemistry.* 1979. V. 18. № 18. P. 3989 - 3995.
22. *Sugiyama H., Kilkuskie R.E., Chang L.-H., Ma L.-T., Hecht S.M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 13. P. 3852 - 3854.
23. *Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Сергеев Д.С.* // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. № 9. С. 1193 - 1200.
24. *Zarytova V.F., Sergeyev D.S., Godovikova T.S.* // *Nucl. Acids. Res. Symp. Ser.* 1991. № 24. P. 249.
25. *Burger R.M., Peisach J., Horwitz S.B.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 22. P. 11636 - 11644.
26. *Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П.* // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. № 4. С. 516 - 521.
27. *Berkner K.L., Folk W.R.* // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. № 10. P. 3176 - 3184.
28. *Cantor C.R., Tinoco I.* // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. № 1. P. 65 - 77.
29. *Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В.* // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 7. С. 911 - 920.

Catalytic Cleavage of Target DNA in a Complementary Complex with Bleomycin Derivative of Oligonucleotide

D. S. Sergeev*, T. S. Godovikova, and V. F. Zarytova

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Siberian Division, pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – For the first time, reagents that are capable of catalytic site-specific cleavage of DNA were synthesized based on oligonucleotides. One molecule of reagent (Blm-R)pd(CCAAACA) containing bleomycin A₅ residue (Blm-RH) could degrade three molecules of target DNA pd(TGTTTGCCGAAGGA). The reagent displayed maximum catalytic activity in a temperature range that was close to the melting temperature of the reagent–target DNA complex. The number of the target DNA molecules that could be degraded by the reagent was limited by the degradation of the antibiotic residue itself during the oxidative degradation of the target DNA. The reagent catalyzed the subsequent degradation of residues G⁷, T⁵, T⁴, and T³ of the target DNA at an equimolar reagent–target DNA ratio. When the tenfold excess of the target DNA was used, the reagent degraded primarily the single G⁷ residue of the target DNA by 30%.

Key words: catalytic cleavage of DNA, reactive oligonucleotide derivatives, bleomycin.

* To whom correspondence should be addressed.