



УДК 577.113.4+615.779.9

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ДНК-МИШЕНИ БЛЕОМИЦИНОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ ТЕТРАНУКЛЕОТИДА С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ-ЭФФЕКТОРОВ*

© 1996 г. П. Е. Воробьев, Ю. Я. Маркушин, Д. С. Сергеев, В. Ф. Зарытова[#]*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8*

Поступила в редакцию 18.04.95 г.

Показано, что эффективность сайт-специфического взаимодействия ДНК-мишени с блеомициновыми производными коротких олигонуклеотидов может быть существенно повышена с помощью фланкирующих олигонуклеотидов-эффекторов. Исследовано расщепление 20-звенного одноцепочечного фрагмента ДНК тетрануклеотидным реагентом, содержащим на 5'-конце остаток блеомицина А₅, в присутствии октануклеотидов-эффекторов, несущих на 5'- и 3'-концевых фосфатных группах стабилизирующие дуплекс феназиниевые остатки. Показано, что при добавлении в реакционную смесь двух эффекторов степень модификации ДНК-мишени при 37°C возрастает с 20 до 70%. Расщепление осуществляется сайт-специфически практически по единственному положению (до 90% от общей степени расщепления). Показано, что температура плавления комплементарного комплекса, образуемого тетрануклеотидом, несущим остаток блеомицина А₅, с ДНК-мишенью в присутствии двух эффекторов достигает 45°C, тогда как в отсутствие эффекторов она составляет менее 7°C.

Ключевые слова: блеомициновое производное олигонуклеотида, олигонуклеотиды-эффекторы, расщепление ДНК.

В настоящее время широко ведутся работы по направленному воздействию на нуклеиновые кислоты реакционноспособными производными олигонуклеотидов [1 - 4]. Известно, что эффективность такого воздействия в большой мере зависит от стабильности комплементарных комплексов, образуемых реагентом и мишенью, и от активности присоединенной к олигонуклеотиду химической группировки. Чтобы повысить стабильность дуплексов, часто используют протяженные олигонуклеотиды. Однако в последнее время неоднократно было показано, что для формирования стабильных дуплексов можно использовать короткие олигонуклеотиды с олигонуклеотидными эффекторами [5 - 9]. В 1988 г. [5] был предложен метод повышения эффективности и селективности модификации нуклеиновых кислот реагентами с коротким олигонуклеотидным адресом с помощью эффекторов - N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых производных олигонуклеотидов. Наличие на 5'- и 3'-концах цепи олигонуклеотидов N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых групп увеличивает стабильность образуемых такими эффекто-

рами комплементарных комплексов [10] и улучшает эффекторные свойства олигонуклеотидов.

Влияние эффекторов на процесс модификации нуклеиновых кислот исследовано в основном на примере алкилирующих производных олигонуклеотидов [5 - 9, 11, 12]. Чтобы понять, какие из закономерностей влияния эффекторов, выявленных при алкировании, характерны для большинства реакционноспособных производных олигонуклеотидов, необходимо иметь данные для нескольких типов реакционноспособных групп.

Интересные свойства обнаружены у производных олигонуклеотидов, способных осуществлять сайт-специфическую окислительную деструкцию нуклеиновых кислот, в частности у олигонуклеотидов, несущих хорошо изученный гликопептидный антибиотик блеомицин [13 - 16]. Образующие блеомициновыми производными олигонуклеотидов комплементарные комплексы вопреки ожиданию более стабильны, чем комплексы исходных олигонуклеотидов [13], а блеомицин в составе таких производных сохраняет свою способность каталитически расщеплять ДНК [17]. Обнаруженные свойства блеомициновых производных олигонуклеотидов свидетельствуют о том, что соединения такого типа могут найти широкое

* Префикс "d" в аббревиатуре олигонуклеотидов опущен.

Автор для переписки.

остатка блеомицина А₅ к тетрануклеотиду может значительно изменить стабильность образуемого им комплементарного комплекса. Поэтому нами были проведены эксперименты по термической денатурации комплексов мишень (I) · реагент (II) в присутствии и в отсутствие эффекторов.

Данные по изменению оптического поглощения (A₂₇₀) в интервале 7 - 70°C не позволяют зарегистрировать термическую денатурацию комплементарного комплекса (I) · (II) в отсутствие эффекторов. Температуру плавления комплексов (I) · (II) в присутствии эффекторов оценивали, как и в работе [11], по расчетным кривым, полученным вычитанием дифференциальной кривой термической денатурации комплекса ДНК-мишень · эффектор из дифференциальных кривых термической денатурации комплексов ДНК-мишень · эффектор · реагент. Данные по термической денатурации, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что эффекторы, как (III), так и (IV), обеспечивают формирование комплекса (I) · (II), причем эффектор (IV) стабилизирует такой комплекс несколько сильнее. Присутствие одновременно двух эффекторов значительно повышает температуру плавления комплекса (I) · (II) (см. таблицу).

Полученные результаты хорошо согласуются с данными по стабилизации комплекса немодифицированного тетрануклеотида с ДНК-мишенью октануклеотидными эффекторами [12]. Однако температура плавления комплекса, образуемого блеомицинсодержащим тетрануклеотидом (II) с ДНК-мишенью (I), оказывается, на 7 - 8°C выше температуры плавления комплекса, образуемого тетрануклеотидом рСАГС с мишенью (I) в присутствии эффекторов (III) и (IV), что соответствует ранее полученным данным [13]. Столь высокая температура плавления комплекса (I) · (II) в присутствии эффекторов свидетельствует о его высокой стабильности и позволяет надеяться на достижение эффективного расщепления ДНК в условиях, близких к физиологическим.

Модификации подвергали ДНК-мишень (I), содержащую на 5'-конце ³²P-метку (рис. 1). Модификацию матрицы блеомициновым производным тетрануклеотида исследовали с помощью гель-электрофореза; степень модификации (расщепления) оценивали как описано в "Экспериментальной части".

Известно, что инициируемая блеомицином деградация сахарофосфатного остова ДНК может протекать по двум основным путям [18]. Первый из них приводит к непосредственному расщеплению цепи ДНК (прямые разрывы) с образованием 3'-фосфогликолята и 5'-фосфата в точке разрыва цепи и освобождением пряденала соответствующего гетероцикла. Второй путь приво-

дит к освобождению гетероцикла с сохранением сахарофосфатного остова, который, однако, легко разрушается обработкой 0.2 М 1-бутиламином [19] (щелочеллабильные сайты).

| Эффекторы | Температура плавления, °С | Степень расщепления, % | |
|--------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | | без обработки 1-бутиламином | после обработки 1-бутиламином |
| - | - | 15 | 20 |
| (III) | 28 - 31** | 20 | 45 |
| (IV) | 32 | 30 | 60 |
| (III) + (IV) | 45 | 45 | 70 |

* Термическая денатурация комплементарных комплексов проводилась в буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, 10 мМ каодилат Na, 1 мМ EDTA (рН 7.4), при концентрации компонентов 1.3×10^{-5} М. Условия расщепления ДНК-мишени см. в "Экспер. части".

** Кривая, полученная вычитанием дифференциальных кривых термической денатурации комплексов (I) · (II) · (III) и (I) · (II), имеет невыраженный максимум.

дит к освобождению гетероцикла с сохранением сахарофосфатного остова, который, однако, легко разрушается обработкой 0.2 М 1-бутиламином [19] (щелочеллабильные сайты).

Степень расщепления ДНК-мишени (после обработки 1-бутиламином) при 37°C реагентом (II) в отсутствие эффекторов (рис. 2, дорожка 3) составляет 20%. При добавлении в реакцию смесь одного из эффекторов, (III) или (IV), степень расщепления ДНК-мишени возрастает (см. таблицу), причем использование только эффектора (IV) оказывается более эффективным, чем использование только эффектора (III), что коррелирует с данными по термической стабильности комплекса (I) · (II) в присутствии этих эффекторов. Аналогичная закономерность наблюдалась при модификации данной ДНК-мишени 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламидным производным тетрануклеотида [12]. При добавлении в реакцию смесь одновременно эффекторов (III) и (IV) степень модификации ДНК-мишени достигает 70% (рис. 2, дорожка 6). При этом соотношение образующихся прямых разрывов и щелочеллабильных сайтов соответствует литературным данным [20] (см. таблицу).

Расщепление мишени тетрануклеотидным реагентом (II) в присутствии и в отсутствие дифензилиевых эффекторов осуществляется высокоселективно. Основным остатком, по которому происходит модификация реагентом (II), - C¹⁰ (85 - 90%) (рис. 2), в то время как расщепление по остатку G¹² составляет около 10% общей степени расщепления. При этом присутствие эффектора (III) или

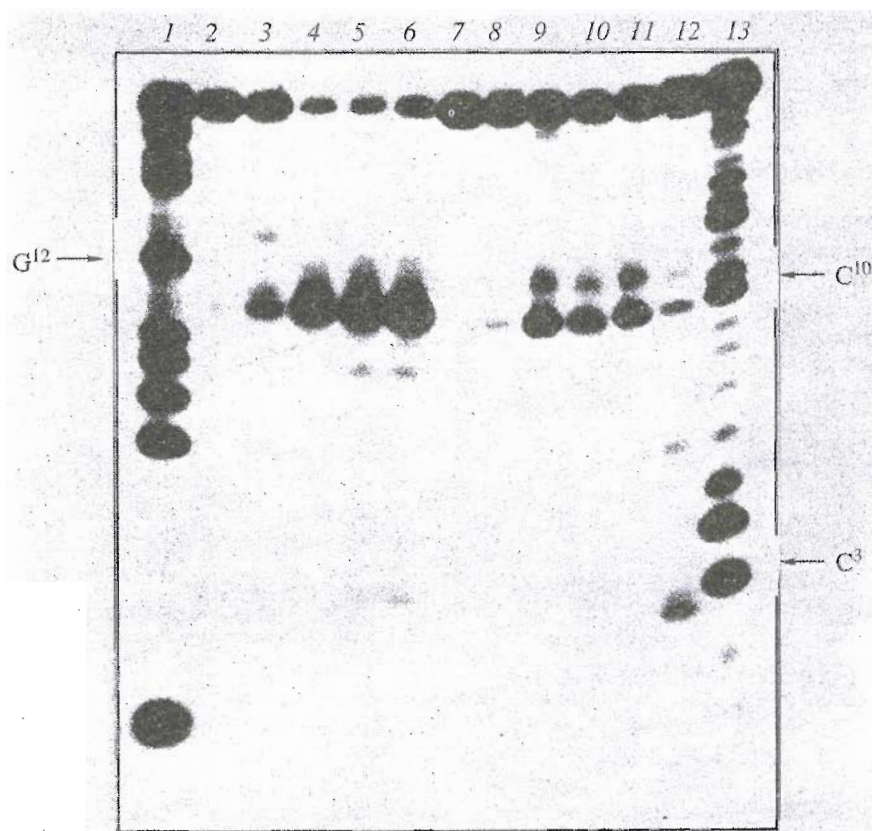


Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения продуктов деструкции 20-звенной ДНК-мишени (I) реагентом (II) в присутствии и в отсутствие эффекторов (III) и/или (IV). Условия реакции – см. “Экспер. часть”. 1, 13 – статистическое расщепление ДНК-мишени по остаткам пуринов и пиримидинов соответственно. Реакционные смеси содержали: 2, 7 – (I); 3, 8 – (I) + (II); 4, 9 – (I) + (II) + (III); 5, 10 – (I) + (II) + (IV); 6, 11 – (I) + (II) + (III) + (IV); 12 – (I) + рСАГС + блеомицин A_5 + (III) + (IV). Пробы 2 - 6 перед разделением обработаны 0.2 М 1-бутиламином (95°C, 8 мин).

(IV) либо их совместное присутствие практически не влияет на позиционную направленность расщепления.

Необходимо отметить, что остаток C^{10} находится в GC-последовательности и, значит, предпочтительнее для расщепления свободным антибиотиком [21, 22]. Для доказательства того, что данное расщепление не является результатом связывания остатка блеомицина с ДНК-мишенью без формирования уотсон-криковского комплекса, было проведено расщепление ДНК-мишени (I) блеомицином A_5 в присутствии рСАГС и эффекторов (III) и (IV). Степень расщепления при этом составила 15% с основными сайтами расщепления C^3 и C^{10} (по 5% каждый) (рис. 2, дорожка 12). Учитывая то, что при воздействии тетра-нуклеотидным реагентом остаток C^3 не модифицируется, можно заключить, что расщепление по остатку C^{10} тетра-нуклеотидным реагентом даже в отсутствие эффекторов протекает благодаря образованию комплементарного комплекса.

Таким образом, в работе показана возможность эффективного расщепления одноцепочечной

ДНК в присутствии олигонуклеотидов-эффекторов реагентами на основе коротких олигонуклеотидов, содержащих в качестве расщепляющей группировки остаток блеомицина A_5 .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали гидрохлорид блеомицина A_5 (95% основного вещества) производства опытного завода Института органического синтеза (Рига, Латвия).

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали модифицированным триэфирным методом [23]. Синтез блеомицинового производного олигодезоксирибонуклеотида (II) проводили по методике [13].

Синтез феназиновых производных олигодезоксирибонуклеотидов (III) и (IV) был выполнен И.А. Пышной по методике [24].

^{32}P -Меченый олигодезоксирибонуклеотид (I) получали как описано [25], используя $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (3000 Ки/ммоль, “Радиоизотоп”, Ташкент), T4-поли-нуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и ADP.

Концентрации олигодезоксирибонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически в буферном растворе, содержащем 0.2 М LiCl и 0.01 М трис-HCl (pH 7.5), на спектрофотометре Spesord M40 (Германия). При этом молярные коэффициенты поглощения при λ 260 нм (ϵ_{260} , М⁻¹ см⁻¹) олигодезоксирибонуклеотидов рассчитывали по методу [26], используя значения ϵ_{260} для моно- и динуклеотидов, приведенные в работе [27]. Вклад остатка антибиотика считали равным 16000 [28], а вклад остатка феназина – равным 10000 М⁻¹ см⁻¹ [24].

Температуру плавления всех описанных комплексов определяли на установке для термической денатурации на базе хроматографа "Милюхром" в буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия, 1 мМ EDTA (pH 7.4), при концентрации компонентов 1.3×10^{-5} М.

Эксперименты по модификации ³²P-меченой мишени (I) проводили в 20 мкл буферного раствора, содержащего 0.2 М LiCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.5), при концентрации мишени 5×10^{-7} М, эффлекторов (III) и (IV) 1×10^{-5} М, реагента (II) 2×10^{-6} М и 2-меркаптоэтанола 0.05 М. Реакцию модификации ДНК инициировали добавлением приготовленного в насыщенной аргоном бидистиллированной воде раствора Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ до концентрации 5×10^{-5} М. Реакционную смесь инкубировали 5 ч при 37°C, после чего нуклеотидный материал осаждали, добавляя 10-кратный объемный избыток 2% раствора LiClO₄ в ацетоне. Реакционные смеси, не обработанные или обработанные 0.2 М 1-бутиламином в течение 8 мин при 95°C, подвергали электрофорезу в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (0.09 М трис-H₃BO₃, pH 8.3, 8 М мочевины, 40°C).

Радиоавтограф гель-электрофореза получали экспонированием пленки РМ-В ("Тасма", Казань) при -50°C. Количественные характеристики расщепления получали с помощью лазерного денситометра Ultrascan XL (LKB, Швеция). Степень модификации (расщепления) ДНК-мишени оценивали как отношение площадей пиков, соответствующих продуктам расщепления мишени, к сумме площадей пиков, соответствующих исходной ДНК-мишени и продуктам расщепления.

Авторы благодарят И.А. Пышную за любезно предоставленные N-(2-гидроксиэтил)феназиниевые производные олигодезоксирибонуклеотидов, а также Д.В. Пышного и Е.М. Иванову за помощь при обсуждении результатов работы и в подготовке ее к публикации.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 93-04-7806), Международного научного фонда и правительства России (проект № JJQ100).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodchild J. // Bioconjugate Chem. 1990. V. 1. P. 165 - 186.
2. Helene C., Toulme J.-J. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1049. P. 99 - 125.
3. Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS / Ed. E. Wickstrom. N.Y.: Wiley-Liss, Inc., 1991.
4. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1994.
5. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 102 - 104.
6. Kutyavin I.V., Podyminogin M.A., Bazhina Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Mamaev S.V., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1988. V. 238. P. 35 - 38.
7. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1653 - 1660.
8. Zarytova V.F., Kutyavin I.V., Podyminogin M.A. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1990. V. 55. Spec. Issue. P. 245 - 248.
9. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 895 - 900.
10. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeyev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 414 - 419.
11. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1991. Т. 21. С. 709 - 716.
12. Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A., Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Kutyavin I.V., Ivanova E.M., Zarytova V.F. // Nucl. Acids Res. 1995. In press.
13. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Сергеев Д.С. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1193 - 1200.
14. Sergeyev D.S., Godovikova T.S., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1991. V. 280. P. 271 - 273.
15. Sergeyev D.S., Zarytova V.F., Mamaev S.V., Godovikova T.S., Vlassov V.V. // Antisense Res. Develop. 1992. V. 2. P. 235 - 241.
16. Zarytova V.F., Sergeyev D.S., Godovikova T.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 189 - 193.
17. Сергеев Д.С., Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. № 1.
18. Stubbe J., Kozarich J.W. // Chem. Rev. 1987. V. 87. P. 1107 - 1136.
19. Sugiyama H., Xu C., Murugesan N., Hecht S.M. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 58 - 67.
20. Burger R.M., Peisach J., Horwitz S.B. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 3372 - 3375.
21. D'Andrea A.D., Haseltine W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 75. P. 3608 - 3612.
22. Takeshita M., Grollman A.P., Ohtsubo E., Ohtsubo H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 5983 - 5987.

23. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516 - 521.
24. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 911 - 920.
25. Berkner K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176 - 3184.
26. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65 - 75.
27. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids. V. 1 / Ed. T.E. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975.
28. Sugiura J., Ishizu K., Miyoshi K. // J. Antibiot. 1979. V. 32. P. 453 - 461.

Effector Oligonucleotides Increase Efficiency of Site-Specific Cleavage of Target DNA by Bleomycin Derivatives of Tetranucleotide¹

P. E. Vorob'ev, Yu. Ya. Markushin, D. S. Sergeev, and V. F. Zarytova²

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

Abstract—The efficiency of site-specific interaction of target DNA with bleomycin derivatives of short nucleotides can be significantly increased using flanking effector oligonucleotides. The cleavage of a 20-mer single-stranded target DNA by a tetranucleotide containing a bleomycin A₅ residue at the 5'-end was studied in the presence of effector oligonucleotides bearing phenazine residues at the 5'- and 3'-ends. In the presence of two effectors, the extent of the target DNA modification at 37°C increased from 20 to 70%. Site-specific cleavage occurs, by up to 90%, at a single site of the target DNA. The melting temperature of the complementary complex formed by the bleomycin A₅-modified tetranucleotide and target DNA in the presence of two effectors was 45°C, whereas in the absence of the effectors, below 7°C.

Key words: bleomycin derivatives of oligonucleotides, effector oligonucleotides, DNA cleavage.

¹ Prefix "d" in the abbreviations of oligonucleotides is omitted.

² To whom correspondence should be addressed.