



УДК 577.113(4+7)

ИСКУССТВЕННЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ I. НАПРАВЛЕННОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК 5'-ПЕПТИДИЛОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ОСТАТКИ АРГИНИНА И ЛЕЙЦИНА

© 1997 г. Д. В. Пышный, М. Н. Репкова, С. Г. Лохов, Е. М. Иванова[#],
А. Г. Веньямина, В. Ф. Зарытова

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

Поступила в редакцию 19.06.96 г. Принята к печати 02.12.96 г.

Исследовано взаимодействие ДНК и РНК с олигодезоксирибонуклеотидами и их N-(2-гидроксиэтил)феназиниевыми (Phn) производными по 3'-концевому фосфату, несущими на 5'-концевом фосфате остаток пептида с чередующимися основными и гидрофобными аминокислотами. Выявлено, что введение остатков пептидов $(\text{LeuArg})_n\text{-Gly-NH}_2$ ($n = 2, 3, 4$) в олигодезоксирибонуклеотид вызывает некоторое усиление комплексобразующих свойств последнего – каждая дополнительная пара аминокислот LeuArg увеличивает значение $T_{\text{пл}}$ комплекса $(5')\text{pd}(\text{CACACASAAAAAAC}) \cdot (3')\text{d}(\text{TGTGTGTG})\text{p}(-\text{LeuArg})_n\text{-Gly-NH}_2$ на 1.3°C. Продемонстрировано, что предложенные пептидоолигодезоксирибонуклеотиды не оказывают деструктурирующего воздействия на ДНК и способны сайт-специфично гидролизовать фосфодиэфирные связи РНК. Показано, что локализация мест разрыва и эффективность расщепления РНК существенно различаются при $n = 2, 4$ и $n = 3$. Максимальная степень гидролиза тетрадекарбонуклеотида $(5')\text{p}(\text{GAUUGAAAAUCCCC})$ (до 80%) достигается при использовании пептидоолигодезоксирибонуклеотида $(3')\text{d}(\text{CTAACT})\text{p}(-\text{LeuArg})_4\text{-Gly-NH}_2$. Показана возможность направленного расщепления фосфодиэфирных связей тРНК^{Phe} пептидоолигонуклеотидами $(3')\text{d}(\text{CTAACT})\text{p}(-\text{LeuArg})_n\text{-Gly-NH}_2$ ($n = 3, 4$).

Ключевые слова: пептидоолигонуклеотиды, сайт-специфическое расщепление РНК, термостабильность дуплексов.

Направленное сайт-специфическое воздействие на нуклеиновые кислоты, основанное на принципе комплементарности, т.е. способности олигонуклеотидов связываться с определенными (комплементарными) участками нуклеиновых кислот, лежит в основе конструирования инструментов для исследования взаимодействий между нуклеиновыми кислотами, нуклеиновыми кислотами и белками, диагностики генетических и вирусных заболеваний, а также создания антивирусных и противоопухолевых терапевтических препаратов нового поколения.

В настоящее время комплементарно-адресованные реагенты нашли применение в первую очередь для направленной модификации и расщепления ДНК. Избирательное селективное

расщепление РНК с помощью производных комплементарных олигонуклеотидов остается до сих пор нерешенной проблемой.

В последние годы ведется интенсивный поиск реагентов неферментной природы, способных высокоэффективно и специфично деструктурировать РНК. Статистическое расщепление РНК может быть осуществлено реагентами, действующими либо по окислительно-восстановительному механизму, либо гидролитически. Реагенты второго типа представляются наиболее перспективными, так как они способны избирательно воздействовать на фосфодиэфирные связи в РНК, не повреждая при этом другие биополимеры, в том числе ДНК и белки. К настоящему времени охарактеризован целый спектр низкомолекулярных химических агентов, способных индуцировать статистическое гидролитическое расщепление РНК в близких к физиологическим условиям – поликатионы редкоземельных металлов [1], их комплексы с различными органическими лигандами [2, 3], низкомолекулярные органические амины

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты, Per – $(\text{LeuArg})_n\text{-Gly-NH}_2$, Phn – N-(2-гидроксиэтил)феназиний, p* – $[^{32}\text{P}]$ фосфат, префикс "d" в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен, для олигонуклеотидов рибо-ряда введен префикс "r". Остальные сокращения соответствуют общепринятым.

[#] Автор для переписки.

[4, 5], различные типы циклодекстринов [6], олигопептиды и их аналоги [7–10].

Возможность специфического воздействия на природные РНК в системах *in vitro* была продемонстрирована на примере использования конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов, несущих остатки имидазола [11] или этилендиамина [12] (гидролизуют фосфодиэфирные связи в РНК), а также олигонуклеотидных производных терпиридила, хелатирующего ионы меди [13], и кобальт-коррина [14], которые способны расщеплять РНК по окислительно-восстановительному механизму.

Направленное гидролитическое расщепление РНК было также осуществлено с использованием нуклеаз, адресованных в заданные участки нуклеотидной последовательности путем введения в состав их молекул комплементарных олигодезоксирибонуклеотидов [15]. Однако конъюгирование олигонуклеотидов и ферментов с сохранением активности последних и способности олигонуклеотидов к комплементарным взаимодействиям с НК – достаточно сложная задача.

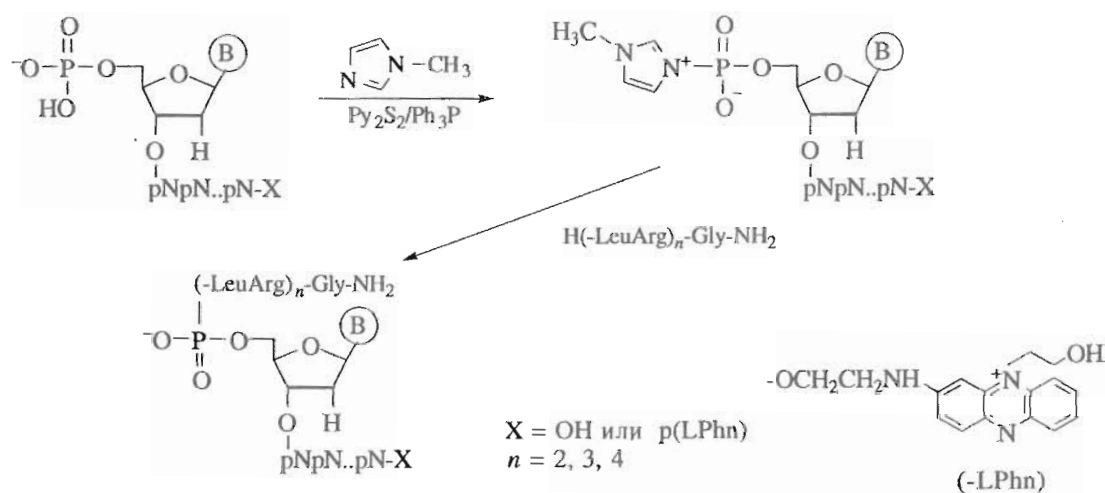
Настоящая работа посвящена конструированию и изучению свойств новых искусственных рибонуклеаз, молекулы которых состоят из олигонуклеотидного “адреса” и ковалентно присоединенного к нему пептида с чередующимися гидрофобными и основными аминокислотами.

Полипептиды такого типа, как было показано в работах [7, 8], в свободном состоянии способны вызывать статистический гидролиз фосфоди-

эфирных связей в гомологичных последовательностях олиго- и полирибонуклеотидов. Можно ожидать, что присоединение аналогичных коротких пептидов к олигодезоксирибонуклеотидному адресу позволит получить реагенты, способные направленно расщеплять РНК.

Эффективность взаимодействия НК с производными олигонуклеотидов зависит от гибридных свойств последних. Ранее было показано, что введение в алкилирующие производные коротких олигодезоксирибонуклеотидов N-(2-гидроксиэтил)феназиниевой (Phn) группировки по 3'-концевому фосфату через амиолинкер $-O(CH_2)_2NH-$ (L) приводит к увеличению степени алкилирования ДНК-мишени [16]. Поэтому в качестве адресующей части реагента наряду с олигодезоксирибонуклеотидом было использовано также его 3'-феназиниевое производное, синтез которого осуществляли по методу, предложенному в работе [16]. В качестве реакционноспособной группировки были использованы пептиды $(LeuArg)_n-Gly-NH_2$ с числом пар LeuArg от 2 до 4.

Присоединение пептидов $(LeuArg)_n-Gly-NH_2$ ($n = 2-4$) к олигонуклеотиду или его 3'-феназиниевому производному проводили путем образования фосфамидной связи между концевой 5'-фосфатной группой олигонуклеотида или 3'-феназиниевого производного и α -аминогруппой пептида по способу, предложенному нами ранее для синтеза пептидололигонуклеотидов, содержащих остатки аргинина [17] (схема).



Особенностью данного подхода является использование в реакции конденсации деблокированных олигонуклеотидов, поскольку селективная активация концевой фосфатной группы олигонуклеотидов с помощью трифенилфосфина и дипиридилдисульфида в присутствии нуклео-

фильного катализатора N-метилимидазола протекает без включения в этот процесс межнуклеотидных фосфатных групп и нуклеофильных центров гетероциклических оснований. Образующееся в процессе активации N-метилимидазольное производное олигонуклеотида способно

быстро взаимодействовать с аминами в широком диапазоне pK_a , причем с ростом pK_a скорость образования фосфамидной связи увеличивается [17]. В присоединяемых пептидах наиболее основной является гуанидиниевая группировка аргинина. Однако при использовании пептида в виде трифторацетатной соли гуанидиниевая группировка в условиях проведения реакции остается протонированной и во взаимодействии с активированным фосфатом олигонуклеотида вступает концевая α -аминогруппа пептида [17]. Наличие P-N-связи в образующихся пептидоолигонуклеотидах было доказано с помощью ^{31}P -ЯМР-спектроскопии и путем кислотного гидролиза пептидоолигонуклеотида в условиях расщепления фосфамидной связи. Присоединение пептида к олигонуклеотиду приводит к увеличению гидрофобности последнего, что регистрируется при обращенно-фазовой хроматографии по увеличению времени удерживания на колонке продукта реакции по сравнению с исходным олигонуклеотидом [17]. Эти характеристики синтезированных пептидоолигонуклеотидов и их фенанзиновых производных приведены в "Экспериментальной части".

Изучение взаимодействия пептидоолигодезоксирибонуклеотидов с НК на первом этапе работы было проведено на модельных дуплексных системах с использованием в качестве мишеней тетрадекануклеотидов.

Первоначально было исследовано взаимодействие пептидоолигодезоксирибонуклеотидов с дезоксирибоматрицей в дуплексе (1):



a) X = p(-LeuArg) $_n$ -Gly-NH $_2$ ($n = 2-4$); б) X = p

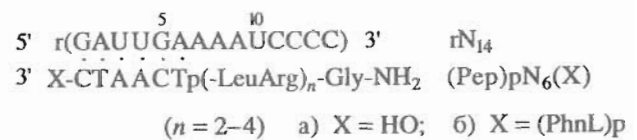
Было установлено, что инкубация дуплексов (1a) ($n = 2-4$) в течение 48 ч при комнатной температуре в том же буфере не приводит к деградации олигодезоксирибонуклеотидной цепи (данные не приведены). Это позволило использовать данную систему для оценки влияния остатков пептидов в пептидоолигодезоксирибонуклеотиде на комплексообразующие свойства олигонуклеотидной части реагента, поскольку в условиях исследования термической денатурации дуплекса пептидный остаток вызывает, как показано ниже, гидролиз РНК-мишени. Исследование проводили, определяя температуры плавления дуплексов (1a, 1б).

Как видно из табл. 1, остаток пептида не только не препятствует образованию комплекса олигонуклеотида с мишенью, но и приводит к некоторой стабилизации дуплекса, которая увеличивается с удлинением пептидного остатка.

Таблица 1. Температуры плавления дуплексов, образованных тетрадекадезоксирибонуклеотидом pCACACAAAAAAS с олигонуклеотидом p(GT) $_4$ (дуплекс (1б)) и его 5'-P-производными с пептидом (LeuArg) $_n$ -Gly-NH $_2$ (дуплексы (1a))

Дуплекс	n	$T_{\text{пл}}$, °C
(1б)	—	43.6
(1a)	2	46.0
(1a)	3	47.3
(1a)	4	48.6

Возможность расщепления РНК пептидоолигодезоксирибонуклеотидом исследовали на модельном дуплексе (2):



В качестве мишени использовали тетрадекарибонуклеотид (rN $_{14}$), последовательность которого аналогична последовательности антикодонной области тРНК^{Phе} *E. coli* (G30-C44). Этот олигонуклеотид обладает частично самокомплементарными участками и способен образовывать ряд структур, например:



Поэтому предварительно были определены $T_{\text{пл}}$ как самого олигорибонуклеотида rN $_{14}$, так и

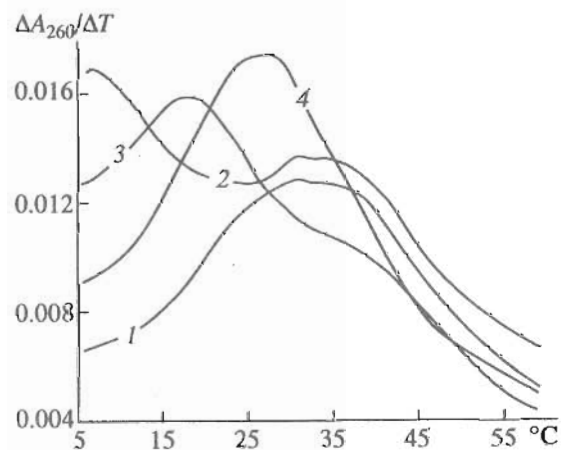


Рис. 1. Дифференциальные кривые термической денатурации (0.1 M NaCl, 0.01 M трис-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA): rN $_{14}$ (1), rN $_{14}$ · pTCAATC (2), rN $_{14}$ · pTCAATCp(LPhn) (3), rN $_{14}$ · pTCAATCp(LPhn) в присутствии 0.6 mM спермина (4). Концентрация каждого олигонуклеотидного компонента 2.5×10^{-5} M.

его комплекса с гексадезоксирибонуклеотидом pN_6 или N-(2-гидроксиэтил)феназиниевым производным $pN_6p(LPhn)$ (рис. 1). Олигорибонуклеотид gN_{14} образует достаточно прочные внутри- или межмолекулярные структуры с $T_{пл}$ 35°C, в то же время его комплекс с гексадезоксирибонуклеотидом имеет $T_{пл}$ менее 5°C, а комплекс $gN_{14} \cdot pN_6p(LPhn)$ – равную 17°C. Добавление в буфер спермина приводит к дополнительной стабилизации комплекса $gN_{14} \cdot pN_6p(LPhn)$, $T_{пл}$ которого достигает в этих условиях 26°C.

Инкубацию рибо-мишени (10^{-7} М) с пептидололигодезоксирибонуклеотидами (10^{-4} М) проводили при комнатной температуре в течение 48 ч, используя $5'$ - ^{32}P -меченый олигорибонуклеотид gN_{14} и анализируя продукты гидролиза РНК-мишени электрофорезом в 20% ПААГ (рис. 2).

Как видно из табл. 2 и рис. 2, исследуемые олигодезоксирибонуклеотидилпептиды $(Per)pN_6p(LPhn)$ и $(Per)pN_6$ ($n = 2-4$) способны расщеплять РНК-мишень, однако глубина и направление гидролиза существенно зависят от числа пар $LeuArg$ в реагенте и условий проведения реакции.

При использовании пептидололигонуклеотида, содержащего три пары $LeuArg$ ($n = 3$), гидролиз РНК-мишени (~5%) наблюдается только при наличии в буфере спермина (рис. 2, 8). В условиях максимально возможной стабилизации комплекса реагент-мишень, т.е. при использовании феназинийсодержащего реагента $(Per)pN_6p(LPhn)$, обладающего повышенными комплексообразующими свойствами, степень протекания реакции возрастает до 20%. Гидролиз мишени протекает преимущественно по связи U10-C11 (рис. 2, 7).

При использовании реагентов с $n = 2, 4$ степень расщепления мишени не коррелирует со стабильностью дуплекса. Максимальная степень гидролиза РНК-мишени (80%) достигается под действием реагента $(Per)pTCAATC$ ($n = 4$), не имеюще-

го остатка феназиния, и в отсутствие спермина в буфере, причем расщепление происходит преимущественно по связи G1-A2 и в меньшей степени по связям U3-U4 и G5-A6 (рис. 2, 12). Добавление в реакционную смесь спермина и введение в реагент остатка Phn , стабилизирующего дуплекс, приводит к снижению степени гидролиза рибо-мишени (рис. 2, 9, 10). Аналогично, хотя и в меньшей степени, протекает гидролиз РНК-мишени при использовании пептидололигонуклеотидов с $n = 2$ (рис. 2, 5, 6, 11).

Однако следует отметить, что свободные пептиды $(LeuArg)_n-Gly-NH_2$ ($n = 2-4$) в этих условиях не вызывают гидролиз фосфодиэфирных связей рибо-мишени (например, рис. 2, 2). Описанное ранее в работе [7] статистическое расщепление полирибонуклеотидов полипептидами $(LeuArg)_n$ протекает в достаточно жестких условиях (50°C, pH 8.0; 2 нед) по сравнению с условиями, используемыми в данной работе.

В контрольных экспериментах было также установлено, что смесь пептидов $(LeuArg)_n-Gly-NH_2$ ($n = 2-4$) с олигонуклеотидом pN_6 или $pN_6p(LPhn)$, а также пептидный конъюгат с некомплементарным олигонуклеотидом $(Per)pACAGTTCp(LPhn)$ не вызывают расщепления мишени rgN_{14} (например, рис. 2, 3, 4). Добавление в реакционные смеси, содержащие $(Per)pTCAATCp(LPhn)$ ($n = 2-4$) дифеназиниевого производного этого же олигонуклеотида $(PhnL')pTCAATCp(LPhn)$ ($L' = -NHCH_2CH_2CH_2NH-$), образующего с мишенью более прочный комплекс, чем реагент $(Per)pTCAATCp(LPhn)$, и конкурирующего с реагентом за место связывания, приводит к существенному снижению степени расщепления РНК-мишени: гидролиз протекает во всех случаях ~ на 5% (табл. 2).

Таким образом, совокупность полученных данных говорит о том, что проявление гидроли-

Таблица 2. Степень гидролиза РНК-мишени $p^*r(GAUUGAAAUAUCCS)$ пептидололигодезоксирибонуклеотидами

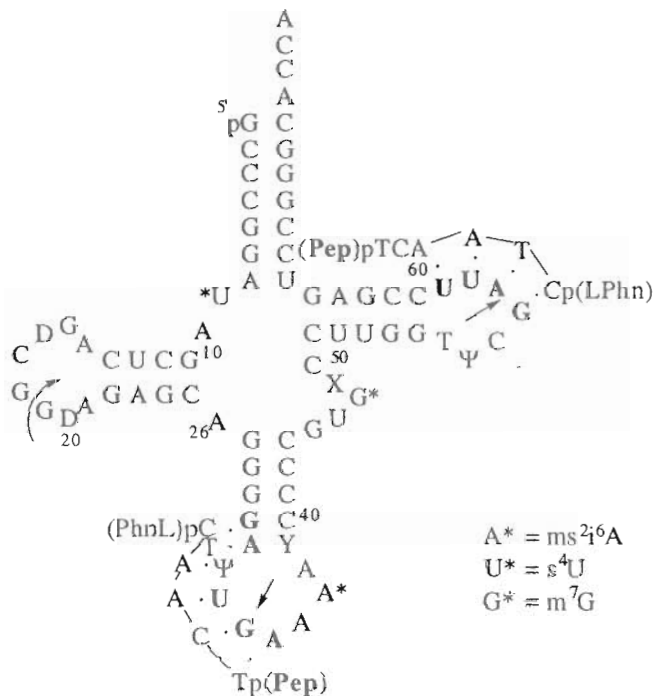
Пептидололигонуклеотид [#]	Число пар $LeuArg$	Степень гидролиза, %	
		без спермина	в присутствии спермина
$(Per)pTCAATC$	2	40	30
$(Per)pTCAATC(LPhn)$	2	30	30
$(Per)pTCAATC$	3	–	5
$(Per)pTCAATCp(LPhn)$	3	–	20
$(Per)pTCAATC$	4	80	70
$(Per)pTCAATCp(LPhn)$	4	45	25
$(Per)pACAGTTCp(LPhn)$	2-4	–	–
$(Per)pACAGTTC$	2-4	–	–
$(Per)pTCAATCp(LPhn) + (PhnL')pTCAATCp(LPhn)$	2-4	Нет данных	5

[#] $Per = (LeuArg)_n-Gly-NH_2$, $L' = -NH(CH_2)_3NH-$

тической активности пептидного остатка в реагенте может быть обусловлено наличием адресующего олигонуклеотида.

Наблюдаемые различия во взаимодействии РНК-мишени и пептидоолигонуклеотидов с $n = 3$ и $n = 2, 4$, вероятно, связаны с различной пространственной организацией молекул последних и образуемых ими комплексов.

Возможность сайт-специфического гидролиза фосфодиэфирных связей в природных РНК пептидоолигодезоксирибонуклеотидами исследовали, используя в качестве мишени тРНК^{Phe} *E. coli*, а в качестве адресующей части реагента тот же гексадезоксирибонуклеотид рТСААТС, который имеет два возможных места комплементарного связывания с последовательностью оснований тРНК^{Phe} *E. coli*. Одно из них, полностью комплементарное, находится в области антикодоновой петли (G30–A35), другое, частично комплементарное, – в ТψС-петле (G57–U60).



При инкубации тРНК^{Phe} с пептидоолигодезоксирибонуклеотидами (Pep)рТСААТСр(LPhn) ($n = 3, 4$) в течение 48 ч при комнатной температуре происходит расщепление фосфодиэфирных связей в области D-петли, в ТψС-петле (G57–A58) и, в меньшей степени, в антикодоновом участке (G34–A35) (рис. 3, 5 и 4 соответственно).

Расщепление связей в области D-петли, вероятно, является следствием возможной пространственной сближенности ее с ТψС-петлей, имеющей частичный сайт связывания реагента. Следует отметить, что направленность воздействия реагентов (Pep)рТСААТСр(LPhn) ($n = 3, 4$) на тРНК не зависит от длины пептидного остатка,

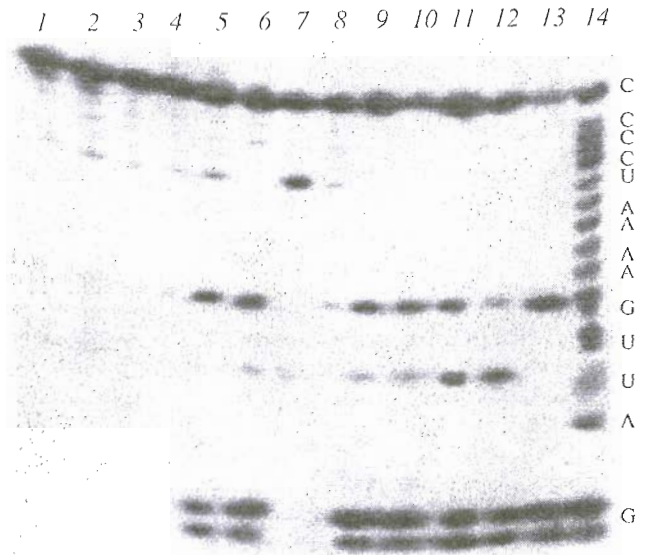


Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов гидролиза 10^{-7} M олигонуклеотида р*т(GAUUGAAAAUCCCC) (1) (0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM трис-HCl (pH 7.5), 48 ч, 20°C) в присутствии реагентов (10^{-4} M): (LeuArg)₄-Gly-NH₂ (2), (LeuArg)₄-Gly-NH₂ + рТСААТС (3), (Pep)рACAGTTCр(LPhn) ($n = 4$) (4), (Pep)рТСААТСр(LPhn) ($n = 2$) (5), (Pep)рТСААТС ($n = 2$) (6, 11), (Pep)рТСААТСр(LPhn) ($n = 3$) (7), (Pep)рТСААТС ($n = 3$) (8), (Pep)рТСААТСр(LPhn) ($n = 4$) (9), (Pep)рТСААТС ($n = 4$) (10, 12); в отсутствие спермина (11, 12), в присутствии 0.6 mM спермина (2–10), а также РНКазой T1, 20 ед. акт./мл, 5 мин (13), при pH 9.5, 30 мин (14).

как это наблюдалось в случае короткого олиго-рибонуклеотида ргN₁₄, хотя степень гидролиза тРНК существенно уменьшается при переходе от реагента, содержащего остаток пептида с $n = 4$, к реагенту с $n = 3$.

Пептидоолигодезоксирибонуклеотиды (Pep)рGTGTGTGT и (Pep)рACAGTTCр(LPhn) ($n = 3, 4$), не имеющие мест комплементарного связывания, как и свободный нонапептид (LeuArg)₄-Gly-NH₂, не вызывают гидролиз тРНК (например, рис. 3, 2 и 3).

Полученные данные говорят о том, что локализация мест разрыва в цепи РНК может быть обусловлена образованием комплекса РНК с олигонуклеотидной частью реагента.

Таким образом, исследованные соединения представляют несомненный интерес как искусственные рибонуклеазы. Причины различия в характере протекания реакции, степени и сайтах расщепления мишени пептидоолигонуклеотидами с различной длиной пептидного остатка (-LeuArg)_n-Gly-NH₂ при $n = 2, 4$ и $n = 3$ могут быть вызваны их различной пространственной организацией и являются предметом нашего дальнейшего исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали пептиды $(\text{LeuArg})_n\text{-Gly-NH}_2$ ($n = 2-4$) производства ГНЦ "Вектор" (Россия).

N-(2-Гидроксиэтил)феназиния хлорид любезно предоставлен В.Н. Сильниковым (НИБХ СО РАН), тРНК^{Phe} *E. coli* любезно предоставлена Н.А. Моор (НИБХ СО РАН).

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе по [18], олигорибонуклеотиды – твердофазным Н-фосфонатным методом по [19].

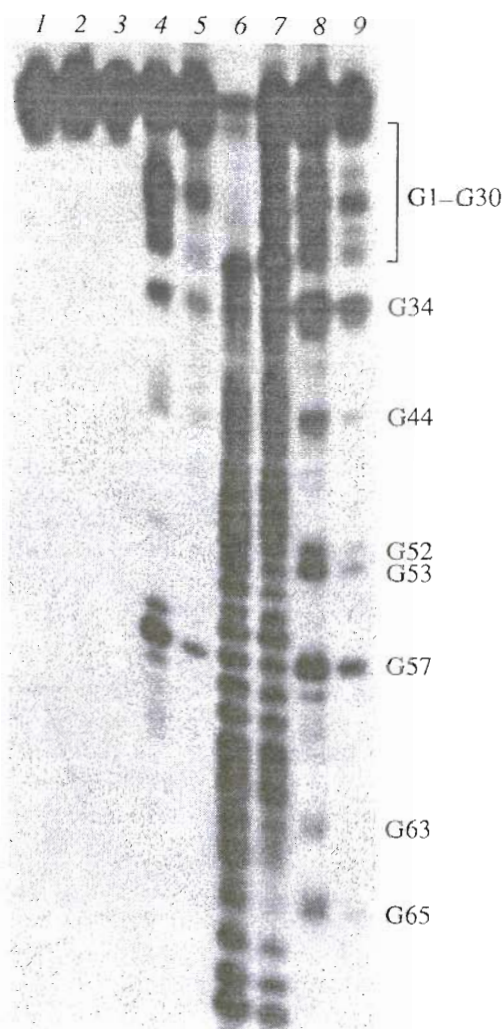


Рис. 3. Радиоавтограф электрофореза в 15% денатурирующем ПААГ продуктов гидролиза тРНК^{Phe} р*Ср *E. coli* (1) (10^{-7} M) (0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM трис-HCl (pH 7.5), 48 ч, 20°C) в присутствии 10^{-4} M реагентов: $(\text{LeuArg})_4\text{-Gly-NH}_2$ (2), $(\text{Per})\text{рАСАGТТСр(LPhn)}$ ($n = 4$) (3), $(\text{Per})\text{рТСААТСр(LPhn)}$ ($n = 4$) (4), $(\text{Per})\text{рТСААТСр(LPhn)}$ ($n = 3$) (5), а также при pH 9.5, 30 мин (6), 15 мин (7), РНКазой T₁, 20 ед. акт./мл (8), 5 ед. акт./мл (9).

Олигонуклеотиды и их производные выделяли ионообменной (Полисил-СА, НПФ "Теоретической практика", Россия) и обращенно-фазовой (Li-Chrogrep RP 18, Merck) хроматографиями на хроматографе Beckman-332.

$\text{pN}_6\text{p(LPhn)}$, $(\text{PhnL}')\text{pN}_6\text{p(LPhn)}$ получали по методу [16] с выходом 75–80%. Анализ полученных производных олигонуклеотидов проводили методом обращенно-фазовой хроматографии (линейный градиент от 0 до 20% ацетонитрила в 0.05 M LiClO₄ за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), сравнивая времена удерживания исходных олигонуклеотидов и более гидрофобных продуктов реакции ($\Delta t_{\text{уд}}$ – время удерживания относительно исходного олигонуклеотида), а также спектрофотометрически по соотношению поглощения водных растворов целевых продуктов на длинах волн 260 и 530 нм (ϵ_{530} феназиниевого остатка с аминоконкером = $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [16].

рТСААТСр(LPhn) : $\Delta t_{\text{уд}}$ 6 мин, $A_{260}/A_{530} = 4.8$;
 рАСАGТТСр(LPhn) : $\Delta t_{\text{уд}}$ 6 мин, $A_{260}/A_{530} = 5.6$;
 $(\text{PhnL}')\text{рТСААТСр(LPhn)}$: $\Delta t_{\text{уд}}$ 10 мин, $A_{260}/A_{530} = 2.7$

$(\text{Per})\text{рN}_n$, $(\text{Per})\text{рN}_n\text{p(LPhn)}$ синтезировали по методу, описанному в [17]. Цетавлоновые соли 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов (10–30 ОЕ) растворяли в смеси абс. диметилформамида и диметилсульфоксида (по 30 мкл каждого), добавляли по 10 мг трифенилфосфина и дипиридилдисульфида и 8 мкл N-метилимидазола. Реакционную смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре, добавляли 2 мг пептида $(\text{LeuArg})_n\text{-Gly-NH}_2$ ($n = 2-4$) в виде трифторацетатной соли и 2 мкл триэтиламина и выдерживали 1 ч. Олигонуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне. Целевые продукты выделяли обращенно-фазовой хроматографией с выходом 70–80%.

Анализ полученных пептидоолигодезоксирибонуклеотидов и их феназиниевых производных проводили методом обращенно-фазовой хроматографии (условия см. выше), сравнивая времена удерживания исходных олигонуклеотидов и продуктов реакции: $(\text{Per})\text{рТСААТС}$ ($n = 2$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 6 мин;

$(\text{Per})\text{рТСААТС}$ ($n = 3$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 11 мин; $(\text{Per})\text{рТСААТС}$ ($n = 4$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 15 мин;

$(\text{Per})\text{рТСААТСр(LPhn)}$ ($n = 2$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 4 мин; $(\text{Per})\text{рТСААТСр(LPhn)}$ ($n = 3$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 8 мин;

$(\text{Per})\text{рТСААТСр(LPhn)}$ ($n = 4$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 11 мин; $(\text{Per})\text{рGТGТGТGТ}$ ($n = 2$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 5 мин;

$(\text{Per})\text{рGТGТGТGТ}$ ($n = 3$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 10 мин; $(\text{Per})\text{рGТGТGТGТ}$ ($n = 4$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 13 мин;

$(\text{Per})\text{рАСАGТТС}$ ($n = 4$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 14 мин; $(\text{Per})\text{рАСАGТТСр(LPhn)}$ ($n = 4$): $\Delta t_{\text{уд}}$ 20 мин.

Подтверждали наличие и определяли количество свободных (не вовлеченных в образование Р-N-связи) гуанидиновых групп Arg в олигонук-

леотид-пептидных конъюгатах колориметрически, как описано в работе [20]. Гидролиз фосфамидных связей в пептидилолигонуклеотидах (или их феназиновых производных) проводили, обрабатывая 1–2 ОЕ в 20 мкл 0.1 М HCl в течение 18 ч при комнатной температуре. Олигонуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне и выделяли обращенно-фазовой хроматографией. Время удерживания на колонке олигонуклеотидного материала совпадало с временем удерживания соответствующих контрольных олигонуклеотидов (или их феназиновых производных).

Концентрацию олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины ϵ_{260} моно- и динуклеотидов [21] и N-(2-гидроксиэтил)феназинового остатка ($1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [16]). Вклад пептидных остатков в ϵ_{260} олигонуклеотидных производных не учитывался. Концентрацию тРНК^{Phe} *E. coli* определяли, используя $\epsilon_{260} = 5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [22].

Исследование термической денатурации олигонуклеотидных дуплексов проводили в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ EDTA при концентрации олигонуклеотидных компонентов, равной 2.5×10^{-5} М, на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милихром" (Россия) на длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин. Температуру плавления определяли с точностью $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

[5'-³²P]Олигонуклеотиды получали по методу [23], используя [γ -³²P]АТФ.

[3'-³²P]тРНК^{Phe} *E. coli* получали путем введения ³²P с помощью T4-РНК-лигазы [23].

Взаимодействие рибо-мишени (10^{-7} М) с пептидилолигодезоксирибонуклеотидами (10^{-4} М) проводили в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ EDTA (или 0.1 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ EDTA, 0.6 мМ спермин) при 20°C в течение 48 ч. По окончании реакции олигонуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне. Гидролиз РНК-мишеней регистрировали гель-электрофорезом в денатурирующем ПААГ (15–20%) по появлению продуктов деструкции полинуклеотидной цепи. Определение положения разрыва цепи РНК-мишени проводили при сравнении продуктов ее деградации пептидилолигодезоксирибонуклеотидами с продуктами деградации при ограниченном щелочном гидролизе (50 мМ NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9.5, 90°C) и G-специфическом расщеплении РНКазой T₁ (Pharmacia) (25 мМ цитрат натрия, pH 5.0, 1 мМ EDTA, 7 М мочевины, 5 мин, 50°C) [23].

Степень гидролиза РНК-мишени вычисляли как отношение радиоактивности участков геля,

содержащих продукты расщепления, к суммарной радиоактивности в соответствующей дорожке.

Работа финансировалась грантом Государственной программы "Новейшие методы биоинженерии" и грантом Программы "Университеты России".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Breslow R., Huang D.-L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 4080–4083.
2. Stern M.K., Bashkin J.K., Sall E.D. // J. Am. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 5357–5359.
3. Morrow J.R., Buttrey L.A., Shelton V.M., Berback K.A. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 1903–1905.
4. Breslow R., Xu R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 1201–1207.
5. Komiyama M. // J. Synth. Org. Chem. Japan. 1991. V. 49. P. 762–769.
6. Breslow R., Anslyn E., Huang D.-L. // Tetrahedron. 1991. V. 47. P. 2365–2378.
7. Barbier B., Brack A. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 6880–6882.
8. Barbier B., Brack A. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 3511–3515.
9. Podyminogin M.A., Vlassov V.V., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5950–5956.
10. Tung C., Ebricht Y., Shen X., Stein S. // BioMed. Chem. Lett. 1992. V. 2. P. 303–306.
11. Hovinen J., Guzaev A., Azhayeva E., Azhayev A., Lönnberg H. // J. Org. Chem. 1995. V. 60. P. 2205–2209.
12. Komiyama M., Inokawa T. // J. Biochem. 1994. V. 116. P. 719–720.
13. Bashkin J.K., Frolova E.J., Sampath U.S. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 5981–5982.
14. Белков В.М., Крынецкая Н.Ф., Волков Е.М., Шабарова З.А., Крайнова Н.Ю., Новодарова Г.Н., Вольгин М.Е. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 446–454.
15. Manoharan M. // Antisense Research and Applications // Eds S.T. Crooke, B. Lebleu. L.: CRC Press, 1994. P. 330–331.
16. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
17. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Ярмолюк С.Н., Алексеева И.В. // Биополимеры и клетка. 1988. Т. 1. С. 220–222.
18. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Ромащенко В.П. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
19. Веньямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.

20. Невинский Г.А., Лаврик О.И., Газарянц М.Г., Мкртчян Э.С., Акопян Ж.И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 506–518.
21. Cantor C.R., Tinoco I., Jr. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
22. Sampson J.R., Di Renzo A.B., Behlen L.S., Uhlenbeck O.C. // Biochemistry. 1990, V. 29, P. 2523–2532.
23. D'Alessio J.M. // Gel Electrophoresis of Nucleic Acids (a Practical Approach) / Eds R. Rickwood, B.D. Hames. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1982. P. 173–197.

Artificial Ribonucleases. I. Site-directed RNA Cleavage by 5'-Peptidyloligodeoxyribonucleotides Containing Arginine and Leucine Residues

D. V. Pyshnyi, M. N. Repkova, S. G. Lokhov, E. M. Ivanova,
A. G. Ven'yaminova, and V. F. Zarytova

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

Received June 19, 1996; in final form, December 2, 1996

Abstract—The interaction of DNA and RNA with oligodeoxyribonucleotides and their 3'-terminal *N*-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives carrying peptide residues with alternating basic and hydrophobic amino acids at the 5'-terminal phosphate was studied. It was found that the introduction of peptide residues (LeuArg)_{*n*}-Gly-NH₂ (*n* = 2–4) into an oligodeoxyribonucleotide enhances the latter's hybridization ability: each additional LeuArg pair increases the *T*_m value of the (5')pd(CACACACAAAAAAC) · (3')d(TGTGTGTG)p(-LeuArg)_{*n*}-Gly-NH₂ complex by 1.3°C. The reagents did not distort the DNA structure and were capable of site-specific hydrolysis of the phosphodiester bonds of RNA. It was shown that the location of the cleavage sites and the efficacy of the RNA hydrolysis at *n* = 2 and 4 and at *n* = 3 strongly differ. The maximum hydrolysis (80%) of tetradecaribonucleotide (5')p(GAUUGAAAUCCCC) was achieved using peptidyloligodeoxyribonucleotide (3')d(CTAACT)p(LeuArg)₄GlyNH₂. The possibility of directed cleavage of phosphodiester bonds in tRNA^{Phe} by peptidyloligodeoxyribonucleotides (3')d(CTAACT)p(LeuArg)_{*n*}GlyNH₂ (*n* = 3 and 4) was shown.

Key words: peptidyloligonucleotides, site-specific RNA cleavage, duplex thermostability.