



УДК 577.(113.4+323 4)

## СИКВЕНС-СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПИРИМИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК ПРИ КИСЛЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH, РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ КОМПЛЕКСОВ

© 2009 г. Е. Б. Бросалина\*, Е. Н. Демченко\*\*, Ю. Н. Демченко\*\*, В. В. Власов\*\*

\*ГУ Институт клинической иммунологии СО РАМН, 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,

\*\*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 16.01.2009 г. Принята к печати 14.04.2009 г.

Изучено взаимодействие пиримидиновых олигонуклеотидов OLN<sub>15</sub> и OLN<sub>6</sub> и их алкилирующих производных, несущих 4-(3-аминопропил)-*N*-метил-, *N*-2-хлорэтил-анилиновые остатки (RCI) на 5'-концевом фосфате с фрагментом гена человеческого γ-интерферона. При проведении реакции в 150 мМ NaCl при pH 5.4 степень алкилирования двуцепочечной ДНК (дцДНК) составляла 60% для RCI-OLN<sub>15</sub> и 10% для RCI-OLN<sub>6</sub>; при pH 4.0 в 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> степень модификации дцДНК была 100% для RCI-OLN<sub>6</sub> и 50% для RCI-OLN<sub>15</sub>. С помощью неденатурирующего электрофореза показано, что при pH 4.0 в присутствии ионов магния OLN<sub>15</sub> способен образовывать с дцДНК два типа комплексов, один из которых стабилен при pH 5.4 в 10 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, а второй – нет. Обнаружено, что алкилирование протекает эффективно только в составе комплекса, стабильного в 10 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, pH 5.4.

*Ключевые слова:* алкилирующие производные олигонуклеотидов; триплексы; параллельные дуплексы.

### ВВЕДЕНИЕ

Создание методов необратимой инактивации и регуляции экспрессии определенных генов – одна из важнейших задач молекулярной биологии. Перспективным подходом к решению этой задачи является направленное воздействие на конкретные генетические программы с помощью олигонуклеотидов и их производных, способных избирательно взаимодействовать с характерными для этих программ нуклеотидными последовательностями, регулируя эффективность их функционирования. Одним из подходов к решению этой проблемы является использование гомопуриновых и гомопиримидиновых олигонуклеотидов, способных образовывать комплексы с соответствующими участками дцДНК.

Постоянный интерес к изучению образования и стабильности триплексных структур обусловлен перспективами их терапевтического и биотехнологического применения. Триплексобразующие олигонуклеотиды сиквенс-специфически связываются с полипуриин-полипиримидиновыми участками дцДНК. Показано, что образование триплексов напрямую коррелирует с ингибированием транскрипции определенных генов, а также может индуцировать рекомбинационные и репарационные процессы, вызывая изменение интенсивности функцио-

нирования и управляемости генетических программ [1–4]. С помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов может быть осуществлена направленная химическая модификация дцДНК с целью достижения долговременных эффектов для регуляции экспрессии отдельных генов, а также необратимая инактивация определенных генов. Одним из перспективных классов реакционноспособных производных олигонуклеотидов для модификации ДНК являются конъюгаты олигонуклеотидов с алкилирующими группировками. Возможность осуществления модификации ДНК алкилирующими производными пиримидиновых олигонуклеотидов в составе совершенных и несовершенных трехцепочечных комплексов была продемонстрирована нами ранее [5–8].

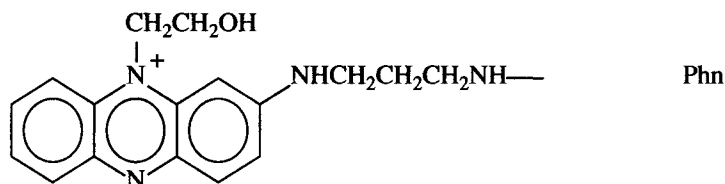
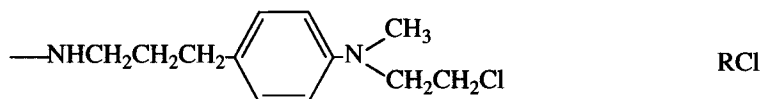
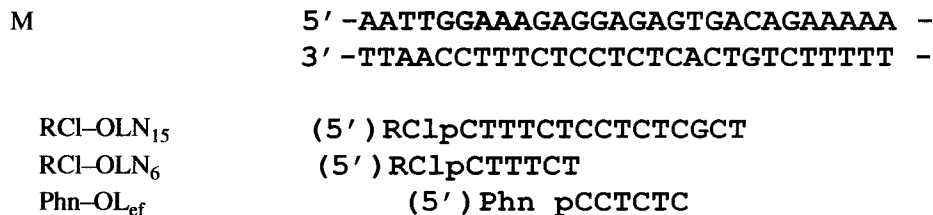
В настоящей работе мы исследовали специфичность и эффективность алкилирования ДНК в различных условиях реакционноспособными производными пиримидиновых олигонуклеотидов различной длины, несущих алкилирующую группу на 5'-концевых фосфатах. В результате этих исследований получены доказательства существования в кислой среде двух видов комплексов пиримидиновых олигонуклеотидов с дцДНК.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объекта модификации был использован фрагмент дцДНК (400 п.о.), входящий в состав

Сокращения: Pnp – феназиний; дцДНК – двуцепочечная ДНК.  
# Автор для связи (тел.: (383) 333-56-42; эл. почта: elena.demchenko@gmail.com).

\*287



**Рис. 1.** Последовательности дцДНК (мишень M), олигонуклеотидов OLN<sub>15</sub>, OLN<sub>6</sub>, олигонуклеотида-эффектора, направленных на эту мишень, и структуры реакционноспособной группы -RCl и феназиниевой группировки. Звездочкой отмечено основание G<sup>287</sup>, по которому идет алкилирование.

кодирующей части гена человеческого  $\gamma$ -интерферона (фрагмент F\*2 в работе [5], далее фрагмент дцДНК, либо дцДНК). Этот фрагмент содержит гомопурин-гомопиримидиновую последовательность (рис. 1), являющуюся мишенью для алкилирующих производных пиримидиновых олигонуклеотидов, несущих 2-хлорэтильную группу на 5'-концевом фосфате. В работе использовали длинный пиримидиновый олигонуклеотид (OLN<sub>15</sub>), короткий олигонуклеотид (OLN<sub>6</sub>), аналогичный 5'-району 15-звенного нуклеотида и олигонуклеотид-эффектор, представляющий собой часть последовательности OLN<sub>15</sub> с 7 по 12 нуклеотид, содержащий и не содержащий на 5'-концевом фосфате феназиниевую группу (рис. 1).

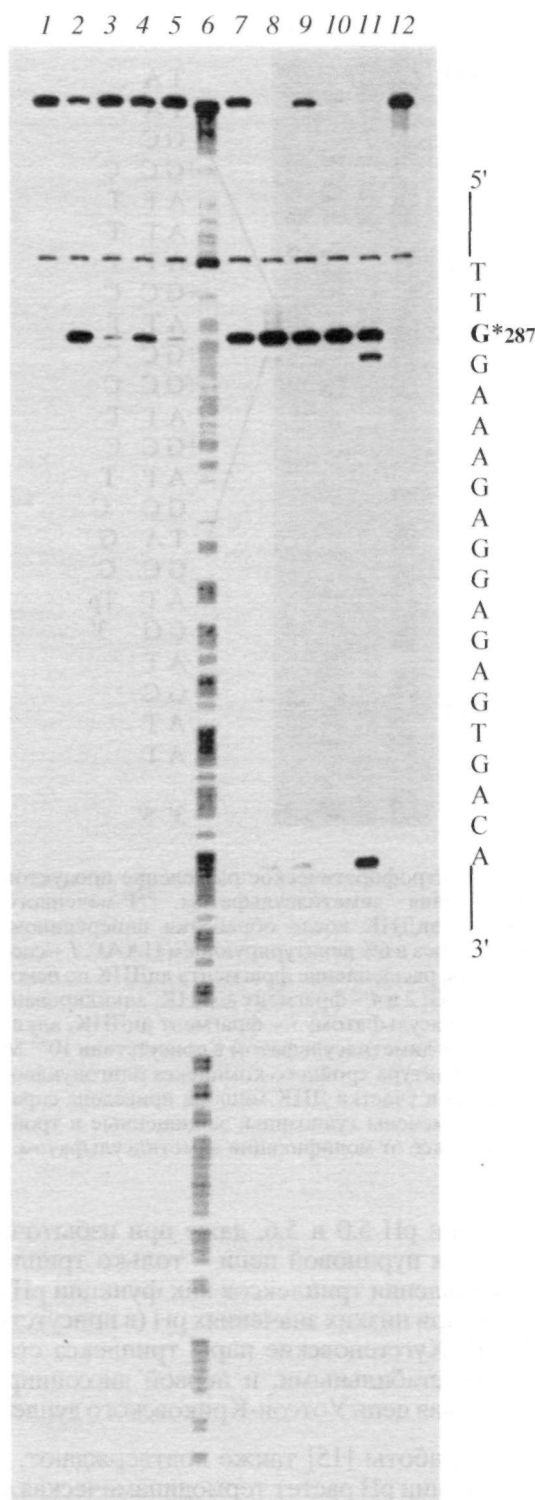
На рис. 2 представлены результаты электрофоретического разделения продуктов модификации (после расщепления пиперидином) дцДНК алкилирующими производными 15- и 6-звенных олигонуклеотидов (RCl-OLN<sub>15</sub> и RCl-OLN<sub>6</sub>). Алкилирование проводили при pH 5.4 в 50 мМ NaOAc, 0.15 М NaCl (условия I), либо при pH 4.0 в 50 мМ NaOAc, 0.15 М NaCl в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (условия II). Видно, что при проведении реакции в условиях I (pH 5.4) степень модификации производным RCl-OLN<sub>15</sub> достигает 60%, тогда как степень модификации производным RCl-OLN<sub>6</sub> была незначительной (рис. 2,

дор. 2 и 3). Добавление олигонуклеотида-эффектора в реакционную смесь, содержащую RCl-OLN<sub>6</sub>, приводит к усилению модификации (рис. 2, дор. 4), при этом в случае присутствия на 5'-концевом фосфате олигонуклеотида-эффектора феназиниевой группы усиление модификации производным RCl-OLN<sub>6</sub> не наблюдается (рис. 2, дор. 5). По-видимому, наличие Phn-группы в эффекторе приводит к нарушению кооперативного эффекта при связывании олигонуклеотидов; возможно, интеркаляция Phn-остатка в дцДНК вызывает излом ДНК-мишени в точке контакта олигонуклеотидов.

В условиях II (pH 4.0 в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub>) картина модификации фрагмента дцДНК другая: степень модификации производным RCl-OLN<sub>6</sub> достигает 100% (дор. 8 на рис. 2), тогда как для реагента RCl-OLN<sub>15</sub> она меняется незначительно (ср. дор. 2 и 7 на рис. 2). Наличие олигонуклеотида-эффектора со свободной фосфатной группой в реакционной смеси приводит к уменьшению степени модификации производным короткого олигонуклеотида, наличие феназиниевой группы в составе эффектора снимает это воздействие (рис. 2, дор. 9, 10).

Повышение концентрации реагента RCl-OLN<sub>6</sub> до  $5 \times 10^{-5}$  М вызывает появление дополнительной точки модификации за счет образования несовер-

**Рис. 2.** Электрофоретическое разделение продуктов модификации  $^{32}\text{P}$ -меченного фрагмента дцДНК ( $4 \times 10^{-9}$  М) алкилирующими производными пиримидиновых олигонуклеотидов  $\text{OLN}_{15}$  и  $\text{OLN}_6$ . Концентрации олигонуклеотидов и реагентов  $2 \times 10^{-5}$  М. Электрофорез в 6% денатурирующем ПААГ. Реакции 1–5 проводили в условиях I, реакции 7–12 в условиях II. 2 и 7 – алкилирование  $\text{RCl-OLN}_{15}$ , 3 и 8 – алкилирование  $\text{RCl-OLN}_6$  без эфффектора, 4 и 9 – в присутствии олигонуклеотида-эфффектора с незамещенным фосфатом, 5 и 10 – в присутствии олигонуклеотида-эфффектора, несущего феназиниевую группу; 6 – А + G-специфическое расщепление фрагмента дцДНК, 11 – фрагмент, алкилированный  $5 \times 10^{-5}$  М  $\text{RCl-OLN}_6$ , 1 и 12 – контрольный интактный фрагмент. Звездочкой отмечено алкилированное основание  $\text{G}^{287}$ .



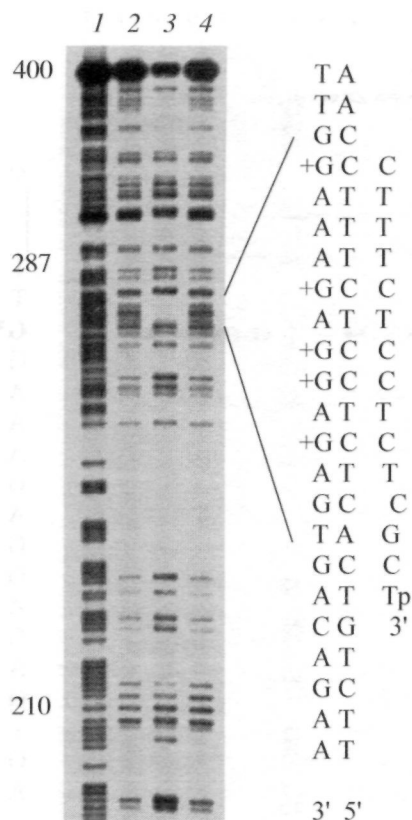
шенного комплекса вблизи с основным местом связывания (рис. 2, дор. 11). Таким образом, в условиях I степень алкилирования дцДНК-мишени коррелирует с длиной олигонуклеотида, то есть со стабильностью триплекса. В условиях II степень алкилирования ДНК-мишени обратно пропорциональна длине олигонуклеотида и, можно предположить, что в данном случае мы наблюдаем образование некоего неканонического комплекса. На рис. 2 видно, что в условиях II модифицируется то же основание  $\text{G}^{287}$  в пуриновой цепи мишени, что и в условиях I, следовательно, связывание  $\text{RCl-OLN}_{15}$  и  $\text{RCl-OLN}_6$  происходит в параллельной по отношению к пуриновой цепи дцДНК-мишени ориентации как в условиях I, так и в условиях II.

Известно, что при низких рН протонирование цитидина ( $\text{C}^+$ ) в третьей цепи ведет к увеличению стабильности триплекса [9, 10]. С другой стороны, изменение солевых условий и рН может приводить к образованию дуплексных структур альтернативных каноническим [11, 12]. Так было показано существование при нейтральных рН параллельных дуплексов, стабилизированных обращенными Уотсон-Криковскими парами, а также продемонстрировано существование параллельного дуплекса, образованного Хугстеновскими парами при рН 5.2. Относительная стабильность дуплексов – параллельного (образованного Хугстеновскими парами) и канонического определяется нуклеотидными последовательностями цепей и условиями проведения эксперимента [10, 13].

Другие авторы [10], на основе УФ-спектроскопии и термодинамических данных, сделали заключение о том, что кривая плавления триплекса, образованного из отдельных цепей при рН 4.2, имеет два перехода. Низкотемпературный переход соответствует диссоциации Уотсон-Криковских пар, высокотемпературный переход относится к плавлению более прочного в этих условиях Хугстеновского дуплекса.

В работе [14] исследовали структуру и относительную стабильность дуплексов и триплексов, образованных отдельными рибо- и дезоксирибооли-

гонуклеотидами, с помощью анализа спектров кругового дихроизма, а также кривых плавления триплексов в зависимости от рН. Согласно их спектральным данным, при рН 8.0 и 7.0 в смеси гомопуринового и гомопиримидинового олигонуклеотидов образуется дуплекс; при рН 6.0 и 6.5 присутствуют как триплексная, так и дуплексная структуры,



**Рис. 3.** Электрофоретическое разделение продуктов алкилирования диметилсульфатом  $^{32}\text{P}$ -меченного фрагмента дцДНК после обработки пиперидином. Электрофорез в 6% денатурирующем ПААГ. 1 – специфическое расщепление фрагмента дцДНК по основаниям A + G; 2 и 4 – фрагмент дцДНК, алкилированный диметилсульфатом; 3 – фрагмент дцДНК, алкилированный диметилсульфатом в присутствии  $10^{-5}$  M OLN<sub>15</sub>. Структура тройного комплекса олигонуклеотида OLN<sub>15</sub> и участка ДНК-мишени приведена справа. (+) – отмечены гуанозины, защищенные в тройном комплексе от модификации диметилсульфатом.

тогда как при pH 5.0 и 5.6, даже при избыточной концентрации пуриновой цепи – только триплекс. Кривые плавления триплексов как функции pH показали, что при низких значениях pH (в присутствии 0.05 M Na<sup>+</sup>) Хугстеневские пары триплекса становятся более стабильными, и первой диссоциирует пиримидиновая цепь Уотсон-Криковского дуплекса.

Авторы работы [15] также подтверждают, что при уменьшении pH растет термодинамическая стабильность параллельного Хугстеневского дуплекса и триплекса в целом, в то время как термодинамическая стабильность Уотсон-Криковского дуплекса несколько уменьшается.

Таким образом, из анализа литературных источников по исследованию образования и диссоциации дуплексных и триплексных структур нуклеиновых кислот следует вывод, что результаты, представленные рис. 2, могут свидетельствовать об образовании

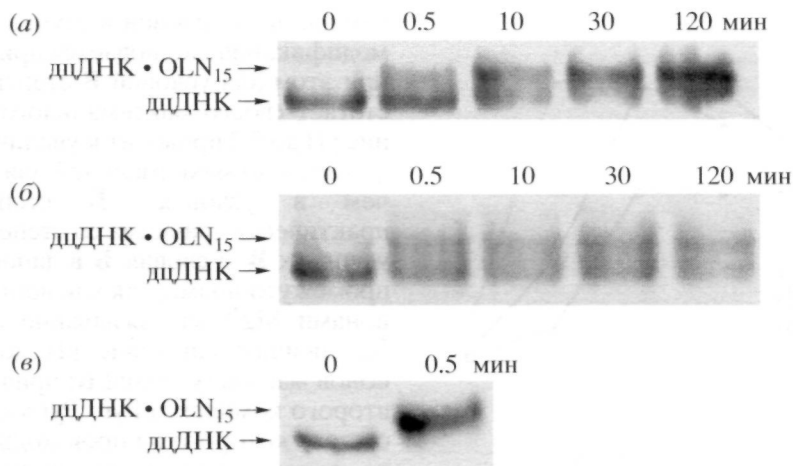
при pH 4.0 в присутствии Mg<sup>2+</sup> как триплексной, так и дуплексной структур.

Для того чтобы получить информацию о структуре комплексов в условиях II, была проведена модификация фрагмента дцДНК диметилсульфатом в отсутствие и в присутствии OLN<sub>15</sub>. Оказалось, что в этих условиях гуанозины пуриновой цепи ДНК, участвующие в образовании комплексов, количественно защищены от модификации (рис. 3, дор. 3). Таким образом, можно сделать вывод: N7-атомы гуанозинов участвуют в образовании водородной связи в составе либо Хугстеневского триплета, либо Хугстеневской пары.

Скорость образования комплекса OLN<sub>15</sub> с ДНК-мишенью была оценена с помощью неденатурирующего гель-электрофореза (рис. 4). Результаты электрофоретического разделения продуктов комплексообразования в условиях I в зависимости от времени инкубации приведены на рис. 4а. Видно, что после инкубации OLN<sub>15</sub> с ДНК-мишенью в течение 30 мин при 20°C, олигонуклеотид количественно связывает дцДНК в комплекс. Электрофоретический анализ продуктов, образующихся в условиях II, в геле, содержащем буферную систему, максимально к ним приближенную (pH 4.0, 50 mM Трис-ацетат, 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>), показывает, что комплексообразование в этих условиях протекает гораздо быстрее: после 30 с инкубации дцДНК с 15-звенным олигонуклеотидом он количественно связывается в комплекс дцДНК · OLN<sub>15</sub> (рис. 4б). Анализ продуктов, образующихся в условиях II, проведенный в геле, содержащем буферную систему при pH 5.4 (50 mM Трис-ацетат, 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>), показывает, что после инкубации в течение 30 с в комплексе связано примерно 50% ДНК, это соотношение остается неизменным и после инкубации в течение 2 ч (рис. 4б). Таким образом, был сделан вывод о том, что в условиях II быстро образуются два комплекса, один из которых стабилен при pH 5.4 в присутствии ионов магния, другой – нет, и оба типа комплексов стабильны в условиях II. При инкубации в условиях I образуется только один тип комплекса, стабильный при pH 5.4 в присутствии ионов магния.

Комплекс дцДНК · OLN<sub>6</sub> таким методом не детектируется, так как диссоциирует в условиях электрофореза.

Скорость образования комплекса при pH 5.4 (условия I) свидетельствует о том, что он является триплексной структурой, в то время как гораздо более высокая скорость связывания ДНК-мишени с 15-звенным олигонуклеотидом при pH 4.0 больше соответствует образованию дуплекса (или дуплексов). Тот факт, что после инкубации при pH 4.0 (условия II) примерно 50% ДНК остается в стабильном комплексе при электрофорезе в условиях, приближенных к условиям I, позволяет предположить, что дуплексы образуются с обеими цепями ДНК и при повышении pH до 5.4 один из них диссоциирует.



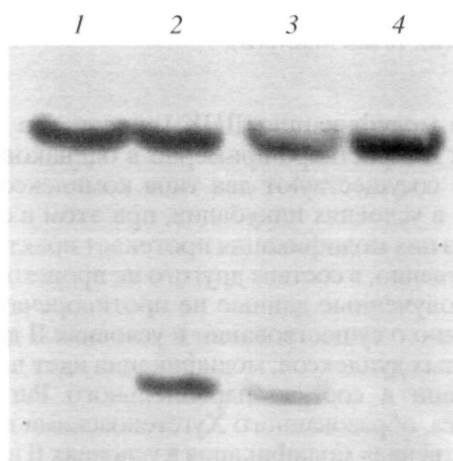
**Рис. 4.** Электрофоретический анализ продуктов комплексообразования  $^{32}\text{P}$ -меченного фрагмента дцДНК с  $\text{OLN}_{15}$  ( $10^{-5}$  М). Инкубацию проводили при  $20^\circ\text{C}$  в течение указанного времени. (а) – Инкубация в условиях I (рН 5.4), электрофорез при рН 5.4; (б) – инкубация в условиях II (рН 4.0); электрофорез при рН 5.4; (в) – инкубация в условиях II (рН 4.0); электрофорез при рН 4.0. Электрофорез в неденатурирующем 4.5% ПААГ, 50 мМ Трис-ацетатный буфер, содержащий 10 мМ  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ .

Известно, что  $\text{poly}[\text{d}(\text{C}-\text{T})]$ -олигонуклеотиды в кислой среде способны формировать дуплексы за счет образования  $\text{C} \cdot \text{C}^+$ -неканонических пар [16]. Анализ нуклеотидных последовательностей пириимидиновой цепи фрагмента ДНК и 15-звенного олигонуклеотида выявляет вероятность образования параллельного дуплекса, содержащего шесть  $\text{C} \cdot \text{C}^+$ -пар и четыре Т-выпетливания. Таким образом, при рН 4.0 мы, видимо, наблюдаем существование двух параллельных дуплексов: один  $\text{Pur} \cdot \text{Pur}$ , образованный Хугстеновскими парами и второй  $\text{Pur} \cdot \text{Pur}$ , образованный  $\text{C} \cdot \text{C}^+$ -парами.

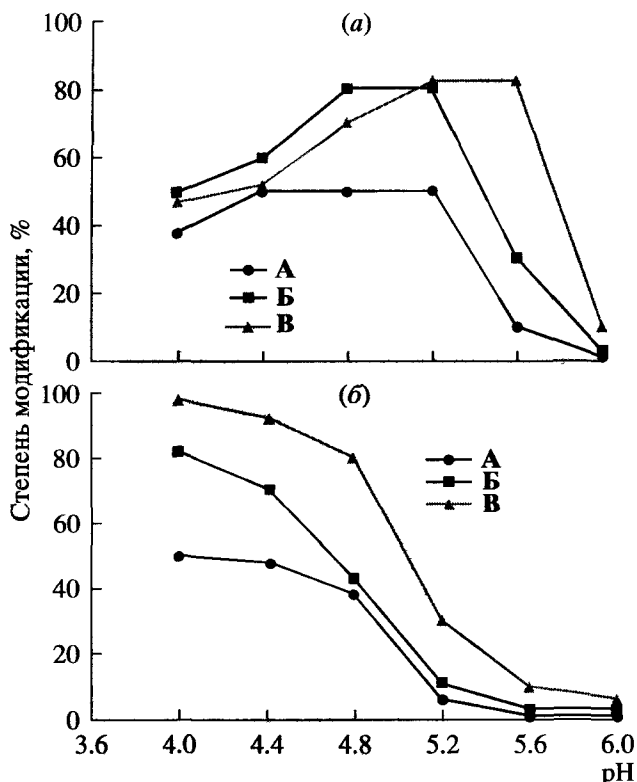
Для того чтобы изучить влияние структуры комплекса на внутрикомплексную реакцию алкилирования, была определена эффективность модификации фрагмента дцДНК алкилирующими производными  $\text{OLN}_{15}$  в составе каждого из двух комплексов, образующихся в условиях II. Комплексы были предформированы инкубацией дцДНК с производным  $\text{RCI-OLN}_{15}$  в условиях II при  $20^\circ\text{C}$  в течение 5 мин. Затем, для создания условий, сходных с теми, что были использованы при неденатурирующем гелеэлектрофорезе, в которых оставался стабильным только один из комплексов, реакционная смесь была разбавлена в 100 раз 50 мМ  $\text{NaOAc}$ , рН 5.4, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  до концентрации олигонуклеотида  $10^{-8}$  М. В качестве контроля использовалась проба без стадии предформирования комплексов в условиях II, в которой концентрация  $\text{RCI-OLN}_{15}$  составляла  $10^{-8}$  М. Опытные и контрольный образцы инкубировали в течение 20 ч при  $20^\circ\text{C}$ .

Из данных, представленных на рис. 5, видно, что в контрольном образце модификации практически не наблюдается, тогда как степень модификации в образце, разбавленном 50 мМ  $\text{NaOAc}$ , рН 5.4, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , почти такая же, как и в образце, инкубиро-

ванном в условиях II без разбавления (дор. 2) (концентрация  $\text{RCI-OLN}_{15} \times 10^{-6}$  М). Отсюда следует, что степень модификации в условиях II обеспечивается реакцией, протекающей в составе комплекса, стабильного при рН 5.4 в присутствии ионов магния. Образование второго типа комплекса не вносит



**Рис. 5.** Электрофоретический анализ продуктов алкилирования дцДНК  $\text{RCI-OLN}_{15}$  в различных условиях. Электрофорез в 6% денатурирующем ПААГ. 1 – контрольный интактный фрагмент ДНК; 2 – дцДНК после инкубации с  $\text{RCI-OLN}_{15}$  ( $10^{-6}$  М) в 50 мМ  $\text{NaOAc}$ , рН 4.0, содержащем 0.15 М  $\text{NaCl}$  и 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  в течение 20 ч; 3 – дцДНК после инкубации с  $\text{RCI-OLN}_{15}$  ( $10^{-6}$  М) в тех же условиях в течение 5 мин. Затем реакционная смесь была разбавлена 50 мМ  $\text{NaOAc}$ , рН 5.4, содержащем 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  до концентрации алкилирующего производного  $10^{-8}$  М и инкубирована в течение 20 ч; 4 – дцДНК после инкубации с  $\text{RCI-OLN}_{15}$  ( $10^{-8}$  М) в 50 мМ  $\text{NaOAc}$ , рН 5.4, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  в течение 20 ч. Температура инкубации везде  $20^\circ\text{C}$ .



**Рис. 6.** Зависимость от pH степени модификации дцДНК алкилирующими производными OLN<sub>15</sub> (а) и OLN<sub>6</sub> (б) в различных солевых условиях. Инкубация в течение 20 ч при 20°C в 50 мМ NaOAc, содержащем соответственно 0.15 М NaCl (А), 0.15 М NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (Б), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (В).

вклада в модификацию ДНК-мишени. То есть, в условиях II в растворе примерно в одинаковом количестве сосуществуют два типа комплексов, стабильных в условиях инкубации, при этом в составе одного из них модификация протекает практически количественно, в составе другого не происходит вообще. Полученные данные не противоречат предположению о существовании в условиях II двух параллельных дуплексов, модификация идет по пуриновой цепи в составе параллельного P<sub>ur</sub> · P<sub>ur</sub>-комплекса, образованного Хугстеновскими парами. Количественная модификация в условиях II в случае алкилирующего производного OLN<sub>6</sub> может быть объяснена высокой скоростью обмена олигонуклеотида между двумя типами комплексов, либо тем, что P<sub>ur</sub> · P<sub>ur</sub>-комплекс не образуется, так как в нем могут принимать участие только две С · С<sup>+</sup>-пары.

Дополнительная информация об особенностях формирования двух видов комплексов была получена при изучении зависимости от pH степени модификации ДНК-мишени производными RCl-OLN<sub>6</sub> и RCl-OLN<sub>15</sub> в различных солевых условиях: А – 50 мМ NaOAc, 150 мМ NaCl; Б – 50 мМ NaOAc, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; В – 50 мМ NaOAc, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Из данных, приведенных на рис. 6а, видно,

что для всех условий в случае RCl-OLN<sub>15</sub> заметная модификация наблюдается при снижении pH до 5.6, при этом для условий В степень модификации достигает своего максимального значения. Понижение pH до 5.2 приводит к увеличению степени модификации до максимальной для условий А и Б, причем в условиях Б степень модификации практически сравнима со степенью модификации в условиях В. Условия Б в данном случае являются промежуточными, так как ионы Na<sup>+</sup> конкурируют с ионами Mg<sup>2+</sup> за связывание с фосфатами ДНК. Дальнейшее снижение pH до 4.8 в присутствии ионов магния (условия В) приводит к образованию второго комплекса P<sub>ur</sub> · P<sub>ur</sub>-типа, алкилирование в составе которого не происходит. Отсутствие обмена олигонуклеотидного производного (OLN<sub>15</sub>) в этих условиях приводит к снижению степени модификации ДНК. То, что обмена действительно не происходит, хорошо видно из рис. 5 (дор. 2 и 3): при разбавлении реакционной смеси Хугстеновский комплекс не диссоциирует и степень модификации остается той же, тогда как в контрольном образце (без предформирования комплекса в высокой концентрации олигонуклеотида) модификация не идет. В случае промежуточных условий В образование P<sub>ur</sub> · P<sub>ur</sub>-нехугстеновского комплекса и снижение степени модификации происходит при более низких pH (4.4). В отсутствие ионов Mg<sup>2+</sup> снижение степени модификации наблюдается только при pH 4.0.

При модификации ДНК алкилирующим производным OLN<sub>6</sub> (рис. 6б) также наблюдается повышение степени модификации в присутствии ионов магния и при понижении pH. Так, для условий В существенное повышение модификации происходит при pH 4.8, а для промежуточных условий Б эффект повышения степени модификации начинает проявляться при более низких pH (4.4). Однако при дальнейшем понижении pH не наблюдается снижения степени модификации, это явление может быть объяснено тем, что в данном случае нет образования P<sub>ur</sub> · P<sub>ur</sub>-комплекса.

По данным авторов работы [15], в отсутствие ионов Na<sup>+</sup> температура плавления Уотсон-Криковского дуплекса в значительно большей степени зависит от наличия ионов Mg<sup>2+</sup>, чем температура плавления Хугстеновского перехода триплекса. В присутствии ионов Na<sup>+</sup> температура плавления Уотсон-Криковского дуплекса почти не зависит от присутствия Mg<sup>2+</sup>, а температура плавления Хугстеновского перехода в этих условиях снижается. Авторы отмечают, что стабильность триплексов с дивалентными катионами выше, чем с моновалентными. Эти данные согласуются с полученными нами результатами. Так при pH 5.6 степень модификации фрагмента производным олигонуклеотида OLN<sub>15</sub> (рис. 6а) выше для условий, в которых присутствуют только ионы Mg<sup>2+</sup> (без ионов Na<sup>+</sup>), что свидетельствует о большей стабильности триплексной структуры. Условия при pH 4.8 являются погранич-

ными, дальнейшее понижение pH вызывает, по-видимому, стабилизацию параллельного дуплекса, образованного Хугстеновскими парами, что в случае OLN<sub>15</sub> ведет к дестабилизации общего триплекса (так как образуется еще и Руг · Руг-комплекс).

Степень модификации фрагмента алкилирующим производным OLN<sub>6</sub> при pH 4.8 и ниже увеличивается значительно, наблюдается стандартная зависимость стабильности дуплекса (параллельного Хугстеновского) от дивалентных и моновалентных катионов. В присутствии ионов Na<sup>+</sup> степень модификации составляет около 50%, ионы Mg<sup>2+</sup> повышают степень модификации почти до 100%. В условиях Б, когда ионы Na<sup>+</sup> конкурируют с ионами Mg<sup>2+</sup> за связывание с фосфатами ДНК, степень модификации составляет немногим больше 80%.

Таким образом, в работе показано, что при взаимодействии пиримидиновых олигонуклеотидов с дцДНК в присутствии ионов магния постепенное снижение pH приводит: 1) при pH 5.4 к стабилизации триплексной структуры и 2) при pH 4.0 к формированию параллельных дуплексов двух типов: Руг · Руг, образованных Хугстеновскими парами, и Руг · Руг, образованных СС<sup>+</sup>-парами. ДНК с параллельной ориентацией цепей принимают участие в регуляции процессов репликации и транскрипции, генетической рекомбинации, процессах мутации и сплайсинге РНК [17], и следовательно, изучение закономерностей образования и стабильности параллельных дуплексных структур может внести значительный вклад в понимание молекулярных механизмов этих процессов. Метод химической модификации является одним из надежнейших инструментов исследования, он позволяет регистрировать даже слабые комплексы, недетектируемые другими методами [6], в настоящей работе с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов получен однозначный ответ на вопрос об ориентации цепей параллельного Руг · Руг-дуплекса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы: агароза, акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид (Sigma-Aldrich, США); диметилсульфат (Serva, Германия); трис-(гидроксиметил)аминометан (Merck, Германия); эндонуклеазы рестрикции BamHI, EcoRI, Eco130, HinfI, MvaI, Sau3A (Fermentas MBI, Литва); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I и T4-полинуклеотидкиназа (СибЭнзим, Россия). Также были использованы отечественные реактивы фирмы "Реахим" степени "ос.ч.": пиперидин, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, мочевины.

Плаزمида p72-4, сконструированная на основе вируса бычьей папилломы и содержащая энхансер вируса мышьяковой саркомы Молони (MSV<sub>EN</sub>), металлотониновый промотор мышцы (MT<sub>PRO</sub>), полную кодирующую последовательность гена челове-

ского  $\gamma$ -интерферона, включающую сигнальный пептид, ранний интрон SV40 и сайт полиаденилирования (SV40 (A)<sub>n</sub>), была любезно предоставлена д-ром N. Sarver (NIH, США) [18]. Плазмиды pTZ18R-F1, содержащая фрагмент 2842 п.о., включающий в себя кодирующую последовательность гена человеческого  $\gamma$ -интерферона, была получена при повторном клонировании по EcoRI- и BamHI-сайтам в вектор pTZ18R [5, 8].

Плазмидные ДНК выделяли щелочным методом, как описано ранее [19], с последующим центрифугированием в градиенте хлористого цезия.

Фрагмент дцДНК (400 п.о.), входящий в состав кодирующей части гена человеческого  $\gamma$ -интерферона, получали путем последовательного трехстадийного расщепления ДНК плазмиды pTZ18R-F1 эндонуклеазами рестрикции: 1. EcoRI и BamHI (фрагмент ДНК 2840 п.о.), 2. Eco130 (фрагмент 1300 п.о.), 3. HinfI и MvaI (фрагмент 400 п.о.). На первой и второй стадиях проводилась промежуточная очистка фрагментов с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, на третьей стадии очистку проводили в 5% ПААГ. Фрагмент метили по HinfI-концевому сайту с помощью [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (Биосан, Россия, уд. акт.  $3.3 \times 10^{-3}$  МКи/пмоль) и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I.

Дезоксирибоолигонуклеотиды CTTTCTCCTCT-CGCT (OLN<sub>15</sub>), CTTTCT (OLN<sub>6</sub>) и CCTCTC (OL<sub>ef</sub>) были синтезированы блочным фосфотриэфирным методом [20] в ИБХФМ СО РАН. Алкилирующие и феназиниевые производные олигонуклеотидов, несущие остатки 4-(3-аминопропил)-*N*-2-хлорэтил, *N*-метиланилина или *N*-2-гидроксиэтилфеназина на 5'-концевом фосфате, синтезировали как описано ранее [21].

Реакцию алкилирования фрагмента дцДНК реакционноспособными производными олигонуклеотидов проводили в 50 mM NaOAc, 0.15 M NaCl, pH 5.4 (условия I), либо в 50 mM NaOAc, 0.15 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 4.0 (условия II). Алкилированную ДНК расщепляли по модифицированным основаниям обработкой 1 M пиперидином в течение 10 мин при 90°C. Продукты расщепления анализировали в 6% ПААГ в 0.05 M Трис-боратном буфере pH 8.3, содержащем 7 M мочевины.

Продукты комплексообразования дцДНК с OLN<sub>15</sub> анализировали электрофорезом в неденатурирующем 4.5% ПААГ, содержащем 50 mM Трис-ацетатный буфер, 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, pH 5.4 или 4.0. Условия электрофореза: напряжение – 10 В/см, температура – 5°C, время – 23 ч.

Интенсивность полос <sup>32</sup>P-меченного фрагмента и продукта модификации измеряли с помощью сканирования радиоавтографов гелей. Степень модификации дцДНК 5'-алкилирующими производными олигонуклеотидов определяли как отношение интенсивности полосы фрагмента, полученного при расщеплении по модифицированному G<sup>287</sup>, к сум-

марной интенсивности полос, соответствующих этому продукту и интактному фрагменту. Степень модификации, равную 1, принимали за 100%.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rogers F.A., Lloyd J.A., Glazer P.M. // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. 2005. V. 5. P. 319–326.
- Kalish J.M., Glazer P.M. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1058. P. 151–161.
- Ye Z., Guntaka R.V., Mahato R.I. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 11240–11252.
- Chin J.Y., Schleifman E.B., Glazer P.M. // *Front. Biosci.* 2007. V. 12. P. 4288–4297.
- Brossalina E.B., Demchenko E.N., Vlassov V.V., Mamaev S.V. // *Antisense Res. Devel.* 1991. V. 1. P. 229–242.
- Brossalina E., Demchenko E., Vlassov V. // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 24. P. 107–111.
- Brossalina E., Demchenko E., Vlassov V. // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 24. P. 262.
- Brossalina E.B., Demchenko E.N., Vlassov V.V. // *Antisense Res. Devel.* 1993. V. 3. P. 357–365.
- Keppler M.D., Fox K.R. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4644–4649.
- Lavelle L., Fresco J.R. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 2692–2705.
- Otto C., Thomas G.A., Rippe K., Jovin T.M., Petico- las W.L. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 3062–3069.
- Liu K., Miles H.T., Frazier J., Sasisekharan V. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 1802–1809.
- Bhaumik S.R., Chary K.V., Govil G., Liu K., Miles H.T. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 4116–4121.
- Hashem G.M., Wen J.D., Do Q., Gray D.M. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 3.
- Sugimoto N., Wu P., Hara H., Kawamoto Y. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 9396.
- Gray D.M., Ratliff R.L., Antao V.P., Gray C.W. // *Structure & Expression* / Eds Sarma R.H., Sarma M.H. New York: Adenine Press, 1988. V. 2. P. 147–166.
- Soyfer V.N., Potaman V.N. *Triple-helical Nucleic Acids*. New York: Springer-Verlag, 1996.
- Sarver N. // Sustained high-level production of recombinant human gamma interferon using a bovin papilloma- virus vector. 1986. European patent 0 198 386.
- Birnboim H.C., Doly J. // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1513.
- Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Кутявин И.В. // *Биоорган. химия*. 1982. Т. 8. С. 224–230.
- Мишенина Г.Ф., Самуков В.В., Шубина Т.И. // *Био- орган. химия*. 1979. Т. 5. С. 886–894.

## Sequence-Specific Interaction of Pyrimidine Oligonucleotides with Double-Stranded DNA at Acidic pH Complexes of Different Types

E. B. Brossalina<sup>a</sup>, E. N. Demchenko<sup>b,\*</sup>, Y. N. Demchenko<sup>b</sup>, and V. V. Vlassov<sup>b</sup>

\*Phone: +7 (383) 333-5642; e-mail: elena.demchenko@gmail.com

<sup>a</sup> Institute of Clinical Immunology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Yadrintsevskaya, 14, Novosibirsk, Russia

<sup>b</sup> Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

The interaction of pyrimidine oligonucleotides (OLN<sub>15</sub> and OLN<sub>6</sub>) and their alkylating derivatives bearing 4-(3-amino)-*N*-methyl and *N*-2-chloroethyl (RCl) aniline residues at the 5'-phosphate with a fragment of the human  $\gamma$ -interferon gene was studied. In the presence of 150 mM NaCl at pH 5.4, the yield of dsDNA alkylation was 60% for RCl-OLN<sub>15</sub> and 10% for RCl-OLN<sub>6</sub>; at pH 4.0 in the presence of 150 mM NaCl and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, the yield of the dsDNA modification product was 100% for RCl-OLN<sub>6</sub> and 50% for RCl-OLN<sub>15</sub>. It was shown by native electrophoresis that OLN<sub>15</sub> could form with the target dsDNA complexes of two types in the presence of magnesium ions at pH 4.0. One of the complexes was stable at pH 5.4 in the presence of magnesium ions, whereas the other was not. We found that only the complex stable in 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, pH 5.4, was effectively alkylated.

*Key words:* oligonucleotide alkylating derivatives; triplex; parallel duplexes