



УДК 577.133.4:541.127

СПЕЦИФИЧНАЯ К ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОДИФИКАЦИЯ  
ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК АЛКИЛИРУЮЩИМ ПРОИЗВОДНЫМ  
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА pT(CT)<sub>6</sub>

Подуст Л. М., Гайдамаков С. А., Абрамова Т. В.,  
Власов В. В., Горн В. В., Федорова О. С.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Показано, что реагент  $[n\text{-ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}]_p\text{T}(\text{CT})_6$  в слабых кислотах модифицирует двухцепочечный фрагмент ДНК длиной 120 п.о., содержащий последовательность A(GA)<sub>6</sub>T(CT)<sub>6</sub>, по единственному нуклеотидному остатку G<sup>29</sup>, расположенному вблизи этой последовательности в полинуклеотидной цепи. Положение места модификации указывает на протекание реакции в составе трехцепочечного комплекса, когда олигонуклеотидная часть реагента имеет ориентацию, параллельную цепи ДНК, состоящей из пуриновых нуклеотидов. Из анализа зависимости степени модификации от концентрации реагента оценена константа связывания реагента с ДНК, равная  $(0,95 \pm 0,03) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  (25°С, рН 5,3, [NaCl]=0,1 М). Показано, что модификация реагентом  $[n\text{-ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}]_p\text{T}(\text{m}^5\text{CT})_6$  характеризуется теми же количественными параметрами, что и в случае вышеуказанного реагента.

Направленная химическая модификация и специфическое расщепление двухцепочечных ДНК могут быть проведены с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов, комплементарных к таким последовательностям в ДНК, которые способны образовывать трехцепочечные комплексы [1–3]. Известно, что трехцепочечные комплексы образуют пуриновые полинуклеотидные последовательности, которые способны присоединять две пиримидиновые полинуклеотидные цепи, одна из которых имеет антипараллельную ориентацию и связывается уотсон-кривовскими водородными связями, а вторая — параллельную ориентацию и связывается хугстенновскими водородными связями с пуриновыми основаниями. Установлено, что трехспиральные комплексы образуются не только для гомонуклеотидных последовательностей [4], но и в случае последовательностей с чередующимися остатками G и A в одной цепи и C и T в двух других [5].

Недавно нами было показано [2, 3], что олигонутидилаты, несущие на 5'-конце алкилирующую группу ClRCH<sub>2</sub>NH(pC)<sub>n</sub> (n=9,15), модифицируют в слабых кислотах двухспиральную ДНК в районе участка G<sub>18</sub>·C<sub>18</sub>, причем положение точек модификации соответствует параллельной ориентации олигонуклеотидной цепи реагентов и последовательности oligo(G) в ДНК.

В работе [1] была проведена специфичная к последовательности модификация двухцепочечных ДНК-мишеней, содержащих участки oligo(A)·oligo(T) и oligo(GA)·oligo(TC), реакционноспособными производными пиримидиновых олигонуклеотидов длиной 11–15 звеньев, несущих группу Fe(II)-EDTA, ковалентно присоединенную к 5'-положению одного из тиминов. Из-за свойств реакционной группы в данной работе не удалось провести модификацию при рН < 7, что необходимо для образования структур, содержащих тройки оснований C·G·C<sup>+</sup>, а также в присутствии двухвалентных катионов Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>, которые должны стабилизировать тройную спираль. Исползованная в работах [2, 3] алкилирующая группиров-

Сокращения: RCl — n-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)фенил, TIPDSi — 1,1',3,3'-тетраизопропилдисулфокса-1,3-диильная защитная группа; префикс «d» везде опущен.



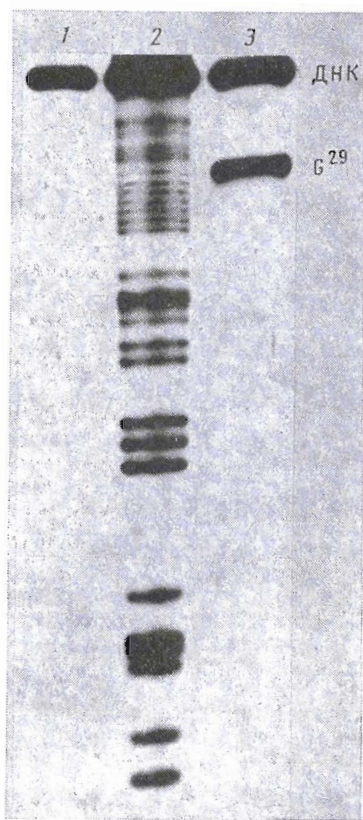


Рис. 2

Рис. 2. Электрофореграмма разделения продуктов модификации рестриктоного фрагмента ДНК реагентом  $\text{ClRCH}_2\text{NHpT}(\text{CT})_6$ . 1 — исходная ДНК; 2 — ДНК, частично расщепленная по остаткам G по методу Максама — Гилберта; 3 — модифицированная ДНК, обработанная пиперидином

Рис. 3. Зависимость предельной степени модификации  $\zeta_\infty$  от pH. ( $[\text{ДНК}] \approx 1 \cdot 10^{-8}$  М,  $[\text{ClRCH}_2\text{NHpT}(\text{CT})_6] = 4,16 \cdot 10^{-5}$  М)

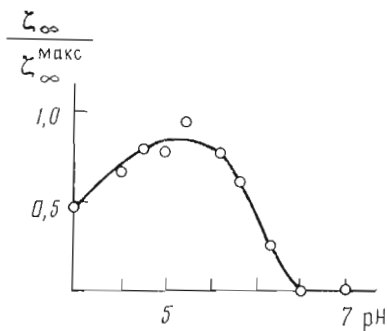


Рис. 3

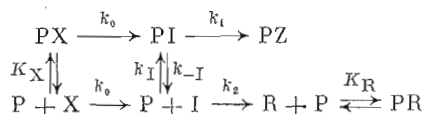
до 23% при  $[\text{Mg}^{2+}] = 0,1$  М ( $[\text{реагент}] = 4,8 \cdot 10^{-6}$  М, буфер: 0,1 М NaCl, 0,01 М К-бифталат, 0,001 М EDTA), т. е. в данных условиях эксперимента ионы  $\text{Mg}^{2+}$  не оказывают существенного влияния на эффективность образования тройной спирали.

Для определения степени модификации второй цепи ДНК-мишени, содержащей последовательность чередующихся пиримидиновых нуклеотидов, в эту цепь вводили метку  $^{32}\text{P}$  по *VamHI*-сайту. Установлено, что степень модификации этой цепи не превышает 1%, причем модификация подвергается остаток  $\text{G}^{29}$ . Известно [8], что реакционная способность гетероциклических оснований по отношению к этилениммониевому катиону, образуемому реагентом в лимитирующей стадии реакции модификации, определяется их нуклеофильностью. Поэтому алкилирующие производные олигонуклеотидов в составе комплементарных комплексов с нуклеиновыми кислотами в первую очередь модифицируют остатки гуанозинов, находящиеся в области, пространственно доступной для реакционноспособной группы реагента. В данном случае при образовании трехцепочечного комплекса олигонуклеотидная часть реагента располагается в большой бороздке уотсон-криковской двойной спирали ДНК-мишени (рис. 1). Поэтому можно ожидать, что наиболее вероятными точками модификации в этом случае являются атомы N7 гуанинов обеих цепей, не участвующие в образовании хугстеновских водородных связей с остатками цитозина реагента, т. е. находящиеся за пределами тройной спирали и пространственно доступные действию реагента. Этим объясняется тот факт, что преимущественно модифицируется остаток  $\text{G}^{29}$  верхней (рис. 1) цепи, тогда как в нижней цепи нет остатка гуанина в положении, оптимальном для действия реагента.

Кинетическая схема механизма модификации нуклеиновых кислот алкилирующими производными олигонуклеотидов выглядит следующим об-



разом [9]:



где P — нуклеиновая кислота-мишень, X — реагент, I — промежуточный этилениммониевый катион, образующийся из реагента в лимитирующей стадии, R — продукт гидролиза реагента, PZ — продукт модификации нуклеиновой кислоты; PX, PI, PR — соответствующие комплексы с мишенью;  $K_X$ ,  $K_R$  — константы ассоциации для PX и PR;  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$  — константы скорости реакций, указанных на схеме. Полагая концентрации I и PI квазистационарными, а концентрации PX и PR квазиравновесными, а также считая, что  $K_X = K_R$ , в случае, когда  $k_1[P] \ll k_2$  и  $P_0$  (полная концентрация мишени) много меньше начальной концентрации реагента  $x_0$ , можно получить выражение для предельной степени модификации ( $\xi_\infty$ ) нуклеиновой кислоты-мишени от концентрации реагента ( $x_0$ ) [9]:

$$\xi_\infty = 1 - \exp[-\gamma_{\text{эфф}} K_X x_0 / (1 + K_X x_0)], \quad (1)$$

где

$$\gamma_{\text{эфф}} = [1 + k_1 / (k_2 K_X)] / (1 + k_{-1} / k_1).$$

Из выражения (1) видно, что оно линеаризуется в координатах

$$1/\ln(1 - \xi_\infty) - 1/x_0.$$

Данная схема, предложенная для модификации одноцепочечных нуклеиновых кислот, применима и для случая модификации двухцепочечных ДНК. На рис. 4 представлена экспериментальная зависимость предельной степени модификации двухцепочечной нуклеиновой кислоты-мишени по остатку G<sup>29</sup> от концентрации реагента при pH 5,3 и ее линейная анаморфоза. Как видно, экспериментальные точки хорошо укладываются на линейную зависимость  $1/\ln(1 - \xi_\infty)$  от  $1/x_0$ . Следовательно, в условиях наших экспериментов, когда концентрация нуклеиновой кислоты-мишени очень мала ( $P_0 = 1 \cdot 10^{-8}$  M), выражение (1) может быть использовано для количественного описания экспериментальных результатов. Обработка величин, представленных на линейной анаморфозе рис. 4б, по методу наименьших квадратов привела к следующим значениям константы связывания реагента с ДНК-мишенью ( $K_X$ ) и параметра  $\gamma_{\text{эфф}}$ :

$$K_X = (0,95 \pm 0,03) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}; \quad \gamma_{\text{эфф}} = 0,53 \pm 0,02.$$

Значение  $K_X$  свидетельствует о том, что сродство используемого в работе реагента к двойной спирали ДНК на несколько порядков ниже, чем величина, ожидаемая для сродства с одноцепочечной ДНК [10]. Отличие параметра  $\gamma_{\text{эфф}}$  от единицы указывает, вероятно, на наличие обмена между промежуточной частицей I, находящейся в растворе и в комплексе с ДНК-мишенью PI.

В работе [11] было показано, что если пиримидиновая полинуклеотидная последовательность вместо цитидина содержит 5-метилцитидин, то трехцепочечные комплексы, включающие в себя тройки оснований m<sup>5</sup>C · G · m<sup>5</sup>C, способны образовываться в нейтральных средах. С целью выяснения возможности проведения модификации исследуемого фрагмента ДНК в нейтральных средах был синтезирован реагент ClRCH<sub>2</sub>NHrT · (m<sup>5</sup>CT)<sub>6</sub>. В отличие от работы [11] в данном случае предполагаемые трехспиральные комплексы должны включать тройки оснований C · G · m<sup>5</sup>C. Экспериментально нами установлено, что модификация данным реагентом исследуемого ДНК рестрикта протекает, однако количественные характеристики (зависимость  $\xi_\infty$  от pH и концентрации реагента) практически не отличаются от данных для неметилированного аналога.

Таким образом, в настоящей работе показано, что алкилирующие производные олигонуклеотидов, состоящих из чередующихся остатков цитидина (или 5-метилцитидина) и тимидина, модифицируют в ДНК последо-

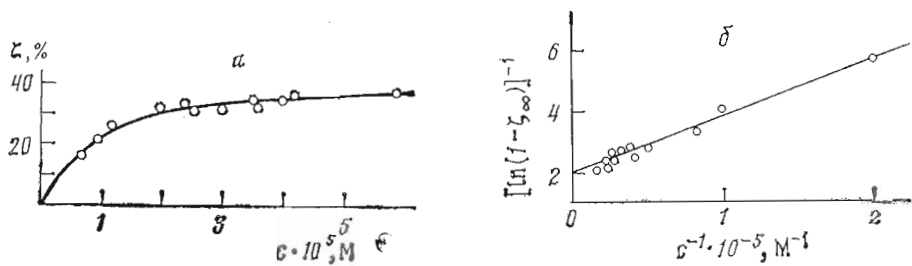


Рис. 4. Зависимость предельной степени модификации  $\xi_{\infty}$  от концентрации реагента  $\text{ClRCH}_2\text{NHpT}(\text{CT})_6$  (рН 5,3) (а) и ее линейная анаморфоза (б)

вательность  $\text{oligo}(\text{GA}) \cdot \text{oligo}(\text{TC})$  в составе трехцепочечного реакционного комплекса, образующегося в слабосильных средах. Поскольку двухцепочечные комплексы  $\text{oligo}(\text{G}) \cdot \text{oligo}(\text{C})$  и  $\text{oligo}(\text{GA}) \cdot \text{oligo}(\text{TC})$  могут присоединять вторую пиримидиновую нуклеотидную цепь и в нейтральных рН, как это следует из данных [1, 7, 10], можно предположить, что путем увеличения длины олигонуклеотидной части реагента или создания каких-либо других условий, стабилизирующих комплекс реагента с ДНК-мишенью, можно провести модификацию последовательности  $\text{oligo}(\text{GA}) \cdot \text{oligo}(\text{TC})$  в нейтральных средах.

### Экспериментальная часть

В работе использовали акриламид,  $N,N'$ -метиленабисакриламид, трис,  $d\text{NTP}$  (Serva, ФРГ), рестриктазы *Bam*HI и *Hind*III (НПО «Фермент», Вильнюс). Остальные реактивы были квалификации ос. ч. или х. ч.

Рекомбинантная плазмида pUR292 7b была получена из вектора pUR292, в который по *Hind*III-сайту был встроены фрагмент кДНК вируса клещевого энцефалита длиной 2050 п. о. Рекомбинантную плазмиду выращивали в клетках *E. coli* K12 M15 и выделяли по методу [12].

Рестрикционный фрагмент ДНК длиной 120 п. о. получали расщеплением ДНК рекомбинантной плазмиды pUR292 7b эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Hind*III.

Метку  $^{32}\text{P}$  по 3'-концу цепи ДНК, содержащей пуриновую олигонуклеотидную последовательность, вводили по *Hind*III-сайту, а пиримидиновую — по *Bam*HI-сайту с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Меченый фрагмент ДНК выделяли с помощью электрофореза в 4% ПААГ, электроэлюции и осаждения спиртом.

Олигонуклеотид pT(CT)<sub>6</sub> был синтезирован триэфирным методом [13]. Реагент  $\text{ClRCH}_2\text{NHpT}(\text{CT})_6$  получали по методу [14], его очищали с помощью микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии на колонках с сорбентом Nucleosil 100-5C-18 (градиент концентрации метанола в 0,02 M трис-ацетатном буфере, рН 8,0) на хроматографе «Милихром» (г. Орел).

Олигонуклеотид T(m<sup>5</sup>CT)<sub>6</sub> синтезирован фосфитамидным методом [15] на синтезаторе «Виктория-5М». 5'-Концевую фосфатную группу вводили с помощью АТР и Т4-полинуклеотидкиназы [12].

$N^4$ -Бензоил-5'-O-(4,4'-диметокситригил)-5-метил-2'-дезокситимидин. 1 г (4,1 ммоль) тимидина обрабатывали 1,3 мл (4,5 ммоль) 1,1',3,3'-тетраизопропил-1,3-дихлордисилоксана в 10 мл безводного пиридина в течение 2 ч аналогично методу [16]. Затем в реакционную смесь добавляли насыщенный водный раствор  $\text{NaHCO}_3$ , упаривали, растворяли остаток в хлороформе и промывали водой. Хлороформный раствор сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали. Затем остаток упаривали с безводным пиридином, растворяли в безводном пиридине (10 мл), добавляли 1,025 мл (6,15 ммоль) *n*-хлорфенилфосфодихлорида и 0,85 г (10,8 ммоль) 1,2,4-триазола и выдерживали 6 сут при  $\sim 20^\circ\text{C}$  аналогично работе [17]. Реакционную смесь обрабатывали раствором  $\text{NaHCO}_3$ , как указано выше. Полученное триазольное производное очищали хроматографией на силикагеле

(градиент концентрации метанола в хлороформе 0–5%) и обрабатывали 20 мл смеси конц. водный аммиак — диоксан (1 : 3) в течение 1 ч, как описано в работе [17]. Реакционную смесь упаривали, остаток высушивали упариванием с безводным пиридином, растворяли в безводном пиридине и обрабатывали 0,713 мл (6,15 ммоль) хлористого бензонла в течение 2 ч [16]. Реакционную смесь обрабатывали так же, как при введении TPD<sub>3</sub>Si-группы. После упаривания хлороформного слоя остаток растворяли в 12 мл 1 М триэтиламмонийфторида в смеси диоксан — тетрагидрофуран (1 : 1) [16]. Через 16 ч в реакционную смесь добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> и обрабатывали как указано выше. Остаток после упаривания хлороформного слоя обрабатывали 20 мин 12 мл смеси водный раствор аммиака — пиридин (1 : 7) и упаривали. Сырой m<sup>5</sup>dC<sup>bz</sup> перекристаллизовывали из метанола, выход 0,32 г (0,93 ммоль). Это количество m<sup>5</sup>dC<sup>bz</sup> обрабатывали 1 ч 0,355 г (1,05 ммоль) диметокситритилхлорида в безводном пиридине (10 мл) [16]. Затем в реакционную смесь добавляли насыщенный водный раствор NaHCO<sub>3</sub> и обрабатывали как указано выше. Полученный (MeO)<sub>2</sub>Tr(m<sup>5</sup>C<sup>bz</sup>) очищали хроматографией на силикагеле (градиент концентрации метанола в хлороформе 0–5%). После осаждения гексаном получали 0,41 г (0,64 ммоль) (MeO)<sub>2</sub>Tr(m<sup>5</sup>C<sup>bz</sup>), что составляет 16% в расчете на исходный тимидин. Для доказательства того, что получено производное 5'-метилцитидина, с 10 мг продукта удаляли бензоильную и диметокситритильную защитные группы, полученный m<sup>5</sup>dC очищали переосаждением эфиром. УФ-спектр: λ<sub>макс</sub> 277 нм, λ<sub>мин</sub> 255 нм (рН 7) и λ<sub>макс</sub> 287 нм, λ<sub>мин</sub> 245 нм (рН 1), что совпадает с литературными данными [18]. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (CD<sub>3</sub>OD), δ, м.д.: 8,23 (H6), 2,03 (5-CH<sub>3</sub>).

Модификацию ДНК проводили в буфере: 0,01 М бифталат калия, 0,1 М NaCl, 0,001 М EDTA, рН 4,0–6,2 при 25° С. Реакционную смесь инкубировали до полной ионизации связи С—Cl в реагенте в течение 25 ч, что в 5 раз превышает время полуреакции [19]. Модифицированную ДНК осаждали 10-кратным по объему избытком 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Для расщепления по остаткам модифицированных цитидинов ДНК растворяли в 10 мкл воды, добавляли 10 мкл диоксана и 20 мкл гидразингидрата и инкубировали 30 мин при 0° С [20]. Затем ДНК осаждали этанолом и промывали 5% ацетилацетоном для более полного удаления гидразингидрата, далее проводили расщепление пиперидином [21]. Затем ДНК осаждали, промывали этанолом, растворяли в 4 мкл 80% формамида, содержащего по 0,05% бромфенолового синего и ксиленцианола, напосили на 10% ПААГ (30×20×0,04 см), содержащий 7 М мочевины, и проводили электрофорез при напряжении 50 В/см. Для радиоавтографии геля использовали рентгеновскую пленку РМ-1.

Для определения степени модификации (ξ<sub>∞</sub>) проводили либо денситометрирование рентгеновской пленки с помощью лазерного сканера UltroScan XL (ЛКВ, Швеция) и рассчитывали отношение площадей пиков продукта к сумме площадей пиков продукта и исходной ДНК, либо вырезали из геля соответствующие полосы, просчитывали их радиоактивность по Черенкову на счетчике Minibeta (ЛКВ, Швеция) и рассчитывали отношение радиоактивностей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mozer H. E., Dervan P. B. // Science. 1987. V. 238. № 4827. P. 645–650.
2. Fedorova O. S., Knorre D. G., Podust L. M., Zarytova V. F. // FEBS Lett. 1988. V. 228. № 2. P. 273–276.
3. Кнорре Д. Г., Зарытова В. Ф., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 4. С. 1006–1009.
4. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. С. 292.
5. Lee J. S., Johnson D. A., Morgan A. R. // Nucl. Acids Res. 1974. V. 6. № 9. P. 3073–3091.
6. Бабкин И. В., Бугорин А. С., Иванова Е. М., Райр А. С. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 3. С. 384–393.
7. Antao V. P., Gray D. M., Ratliff R. L. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 2. P. 719–738.

8. Карнова Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. № 12. Вып. 4. С. 82-95.
9. Кнорре Д. Г., Чумилова Т. А. // Молекуляр. биология. 1978. Г. 12. № 4. С. 814-821.
10. Breslawer K. J., Frank R., Blöcker H., Marky L. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 11. P. 3746-3750.
11. Lee J. S., Woodsworth M. L., Labiner L. J. P., Morgan A. R. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 16. P. 6603-6614.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1985. С. 132-136.
13. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 518-521.
14. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475-481.
15. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарева В. П., Левина А. С., Полищук А. С., Попанов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. Вып. 1. С. 119-123.
16. Oligonucleotide synthesis. A practical approach./Ed. Gait M. J. Oxford Washington: IRL Press, 1984. P. 153-183.
17. Sung W. I. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1981. № 20. P. 1089.
18. Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. Data for Biochemical Research. Oxford: Clarendon Press, 1986. P. 107.
19. Грицева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чумилова Т. А. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210-214.
20. Kirkegaard K., Bus H., Spassky A., Wang J. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 9. P. 2544-2548.
21. Maxam A. M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499-560.

Поступила в редакцию  
6.VII.1988

#### SEQUENCE-SPECIFIC MODIFICATION OF A DOUBLE-STRANDED DNA BY AN ALKYLATING DERIVATIVE OF OLIGONUCLEOTIDE pT(CT)<sub>6</sub>

PODUST L. M., GAIDAMAKOV S. A., ABRAMOVA T. V., VLASSOV V. V., GORN V. V.,  
FEDOROVA O. S.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR*

It is shown that in slightly acidic solution (pH≈5.3) reagent ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>pT(CT)<sub>6</sub> (RCl=-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl) modifies a double-stranded DNA fragment (120 b. p.) containing A(GA)<sub>6</sub>T(CT)<sub>6</sub> sequence at a single nucleotide residue, viz. G<sup>29</sup> located near to this sequence in the DNA chain. The location of this modification point suggests formation of a triple-stranded reactive complex with parallel orientation of the pyrimidine oligonucleotide moiety of the reagent and pyrimine sequence of the target DNA. Analysing the modification extent dependence of the reagent concentration the association constant  $K_x$  between the reagent and DNA was calculated ( $K_x = (0,95 \pm 0,03) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , 25°C, pH=5.3, [NaCl]=0.1 M). The modification by the reagent ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>pT(m<sup>5</sup>CT)<sub>6</sub> has the same quantitative characteristics as in the case of ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>pT(CT)<sub>6</sub>.