



УДК 577.113.4:543.422.25

РАСЩЕПЛЕНИЕ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК-МИШЕНИ БЛЕОМИЦИНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ОБРАЗУЮЩИМИ ТРОЙНОЙ КОМПЛЕКС

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

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

Поступила в редакцию 15.02.94 г.

Показано, что производные гексадекатимидилата, содержащие ковалентно присоединенный остаток противоопухолевого антибиотика блеомицина A_5 , способны образовывать тройной комплекс с двухцепочечной 30-звенной ДНК-мишенью и в составе этого комплекса осуществлять комплементарно-адресованную модификацию. Вместе с этим в условиях 5-кратного избытка реагента по отношению к мишени наблюдается неспецифическое расщепление в основном пиримидинбогатой цепи ДНК-мишени. Сопоставление общих степеней расщепления цепей мишени 5'- и 3'-блеомициновыми производными гексадекатимидилата (25 и 35% для пуринобогатой и 47 и 36% для пиримидинбогатой цепи) с неспецифическим расщеплением (6% для пуринобогатой и 16% для пиримидинбогатой цепи), вызванным 5'-блеомициновым производным гексадекануклеотида, не образующим тройной комплекс, свидетельствует о преобладании сайт-специфического расщепления над неспецифическим. Плавление триплекса, образованного 5'-блеомициновым производным гексадекатимидилата с ДНК-мишенью, происходит при температуре на 5°C ниже (т. пл. 40°C), чем плавление аналогичного триплекса, образованного гексадекатимидилатом. При понижении температуры с 50 до 20°C степень расщепления ДНК-мишени возрастает в соответствии с долей молекул мишени, находящихся в тройном комплексе.

Ключевые слова: тройной комплекс, блеомицин, олигонуклеотиды, сайт-специфическая деструкция ДНК.

Использование реакционноспособных производных олигонуклеотидов, способных воздействовать на выбранные участки двухцепочечной ДНК посредством формирования тройного комплекса, является одним из перспективных направлений в рамках исследований по созданию ген-направленных соединений [1]. В качестве таких производных ранее были использованы олигонуклеотиды, содержащие алкилирующие [2, 3], фотоактивные группировки [4 - 6], группировки окислительно-восстановительного механизма действия [7, 8]. В качестве последних были использованы хорошо известные ДНК-расщепляющие агенты: комплексы EDTA с железом и 1,10-фенантролина с медью. В ряду группировок окислительно-восстановительного механизма действия заслуживает внимания противоопухолевый антибиотик блеомицин [9, 10], с высокой эффективностью вызывающий одно- и двухцепочечные разрывы ДНК [11 - 13], что считается основой его биологи-

ческой активности. Как показано нами ранее, высокая эффективность в деградации ДНК свойственна также блеомициновым производным олигонуклеотидов в составе двойного комплекса [14 - 16]. Эти свойства антибиотика делают привлекательным использование блеомицина в качестве расщепляющей группировки в составе олигонуклеотида, образующего тройной комплекс с целевой двухцепочечной ДНК.

Целью данной работы является исследование деструкции двухцепочечной ДНК блеомициновыми производными олигонуклеотидов, образующими с ней тройной комплекс.

Выбор ДНК-мишени для воздействия олигонуклеотидного реагента в составе тройного комплекса осуществляли в соответствии со следующими требованиями. Во-первых, она должна содержать участок гомопуриновой и гомопиримидиновой последовательностей для формирования тройного комплекса. Во-вторых, прочный тройной комплекс должен образовываться при нейтральных рН, поскольку блеомицин эффективно расщепляет ДНК в пределах рН 7 - 9 [17]. При таких рН образуются прочные тройные комплексы состава $T \cdot A \cdot T$ [18, 19]. В-третьих,

Используемые сокращения: EDTA - N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусная кислота, Blm-RH - блеомицин A_5 . Префикс "d" в аббревиатуре олигонуклеотидов и их производных опущен.

* Автор для переписки.

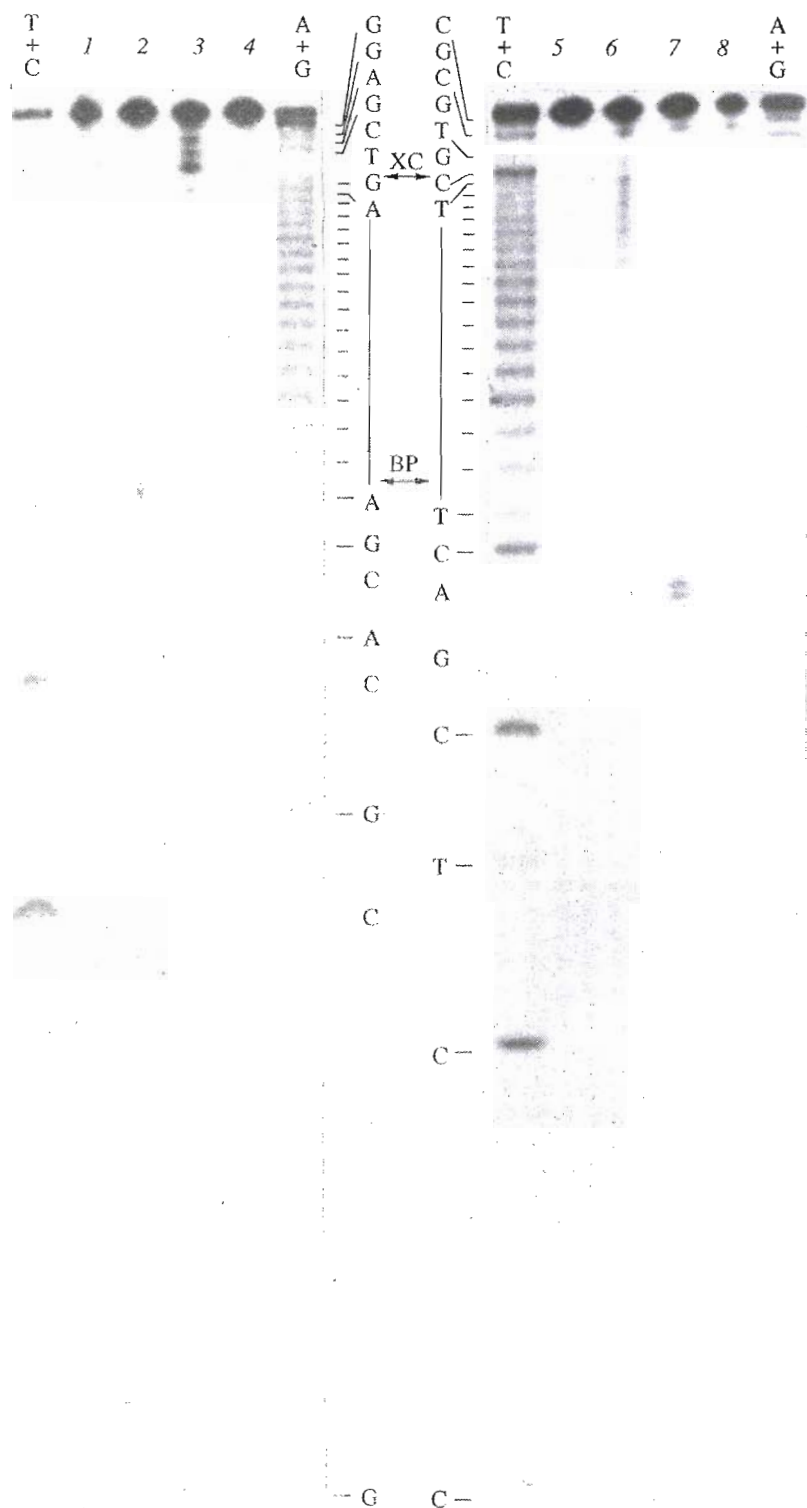


Рис. 2. Радиоавтограф электрофоретического анализа расщепления двухцепочечной ДНК-мишени (1 мкМ) в триплексах I и II блеомицинсодержащими олигонуклеотидными реагентами (5 мкМ) при 20°C. Дорожки 1 - 4 - $5'$ - ^{32}P -меченая А-богатая цепь, дорожки 5 - 8 - $5'$ - ^{32}P -меченая Т-богатая цепь. 1 и 5 - двухцепочечная ДНК-мишень без реагента в условиях реакции; 2, 6 и 3, 7 - расщепление ДНК-мишени соответственно $5'$ - и $3'$ -блеомициновыми производными гексадекатимидилата; 4 и 8 - расщепление ДНК-мишени 16-звенным блеомицинсодержащим олигонуклеотидом (Blm-R)pCAGCGGGATGCAACAS, не образующим тройной комплекс. XC и BP - красители-маркеры ксиленианол и бромфеноловый синий.

было проведено расщепление ДНК-мишени 5'-блеомициновым производным 16-звенного олигонуклеотида (Blm-R)pCAGCGGGATGCAACAC, не образующего тройной комплекс с мишенью. При этом расщепления пуринобогатой цепи практически не происходит (дорожка 4), а пиримидинбогатая цепь, как и в случае блеомициновых производных гексадекатимидилата, расщепляется на 3'-конце по C³⁰, C²⁸ и T²⁶ (дорожка 8). Это свидетельствует о том, что воздействие на двухцепочечную ДНК-мишень 5'- и 3'-блеомициновых производных гексадекатимидилата при 5-кратном избытке последних осуществляется как сайт-специфически, за счет адресовки олигонуклеотидом при образовании тройного комплекса, так и неспецифически, за счет связывания остатка блеомицина с двухцепочечной ДНК.

Сравнивая общие степени расщепления двухцепочечной ДНК-мишени блеомицинсодержащими реагентами (таблица), можно заключить, что как для 5'-, так и для 3'-блеомициновых производных гексадекатимидилата сайт-специфическое расщепление, обусловленное образованием тройного комплекса, преобладает над неспецифическим, обусловленным деструкцией ДНК остатком блеомицина без образования тройного комплекса. При этом расщепление в составе тройного комплекса пиримидинбогатой цепи 3'-реагентом осуществляется по A⁶-T¹¹ (рис. 1, триплекс II) и 5'-реагентом по C²⁴-T¹³ (триплекс I).

Степень расщепления ДНК-мишени блеомициновыми производными олигонуклеотидов можно повысить, увеличив избыток реагента по отношению к мишени. Однако в этом случае можно ожидать, что доля сайт-специфического расщепления уменьшится, поскольку возрастет число молекул реагента, не участвующих в образовании тройного комплекса. Повышение избытка 5'-блеомицинового производного гексадекатимидилата от 1 до 50-кратного по отношению к мишени приводит к увеличению общей степени расщепления с 7 до 63% (рис. 3, дорожки 2 - 5). Такое же повышение избытка 5'-блеомицинового производного олигонуклеотида, не образующего тройной комплекс с мишенью, увеличивает степень расщепления пиримидинбогатой цепи с 2 до 48% (дорожки 6 - 9). Разница между сайт-специфическим и неспецифическим расщеплением оказывается максимальной (31 - 35%) при 5 - 10-кратном избытке реагента над мишенью.

На рис. 4 представлены результаты экспериментов по термической денатурации 30-звенной двухцепочечной ДНК-мишени и ее комплексов с гексадекатимидилатом и 5'-блеомициновым производным гексадекатимидилата. Сравнивая дифференциальные кривые термической денатурации дуплекса и триплексов, можно сделать вывод, что выше 20°C в выбранных условиях начинается

Общие степени расщепления 30-звенной двухцепочечной ДНК-мишени блеомициновыми производными олигонуклеотидов*

Реагент	Общая степень расщепления, %	
	А-богатой цепи	Т-богатой цепи
(Blm-R)pT ₁₆	25	47
T ₁₆ p(R-Blm)	35	36
(Blm-R)pCAGC-GGGATGCAACAC**	6	16

* Условия эксперимента даны в подписи к рис. 2.

** Не образует тройной комплекс с ДНК-мишенью.

процесс плавления третьей цепи из триплекса, который переходит в плавление дуплекса. Степень сайт-специфического расщепления мишени зависит от доли молекул мишени, участвующих в образовании комплекса с реагентом, что подтверждают данные по расщеплению А-богатой цепи 5'-блеомициновым производным гексадекатимидилата при разных температурах (рис. 5): степень расщепления начинает падать при температурах выше 20°C, а при 50°C расщепления практически не происходит.

Присоединение остатка блеомицина к олигонуклеотиду повышает стабильность образуемого им уотсон-криковского комплекса [14]. Стабилизация дуплекса может быть обусловлена наличием положительного заряда у остатка антибиотика, а также способностью блеомицина связываться с ДНК [9, 23]. В случае образования триплекса ситуация оказывается иной. Плавление триплекса, образованного 5'-блеомициновым производным гексадекатимидилата с ДНК-мишенью, происходит при температуре на 5°C ниже (т. пл. 40°C), чем плавление триплекса, образованного гексадекатимидилатом (т. пл. 45°C) (рис. 4).

Одной из причин понижения температуры плавления может быть неудачное для связывания пространственное взаиморасположение остатка антибиотика и спирали ДНК. Из литературных данных [24, 25] следует, что молекула блеомицина связывается с ДНК в малой бороздке двойной спирали. С другой стороны, известно, что третья олигонуклеотидная цепь при формировании тройного комплекса посредством хугстиновского спаривания располагается в большой бороздке ДНК. Можно предположить, что остаток антибиотика в триплексе (несмотря на стерические затруднения) все-таки проникает в малую бороздку и расщепляет ДНК-мишень. Дополнительную подвижность для обеспечения такого связывания может дать частичное нарушение хугстиновского спаривания вблизи места присоединения остатка блеомицина, что понижает стабильность триплекса (рис. 3).

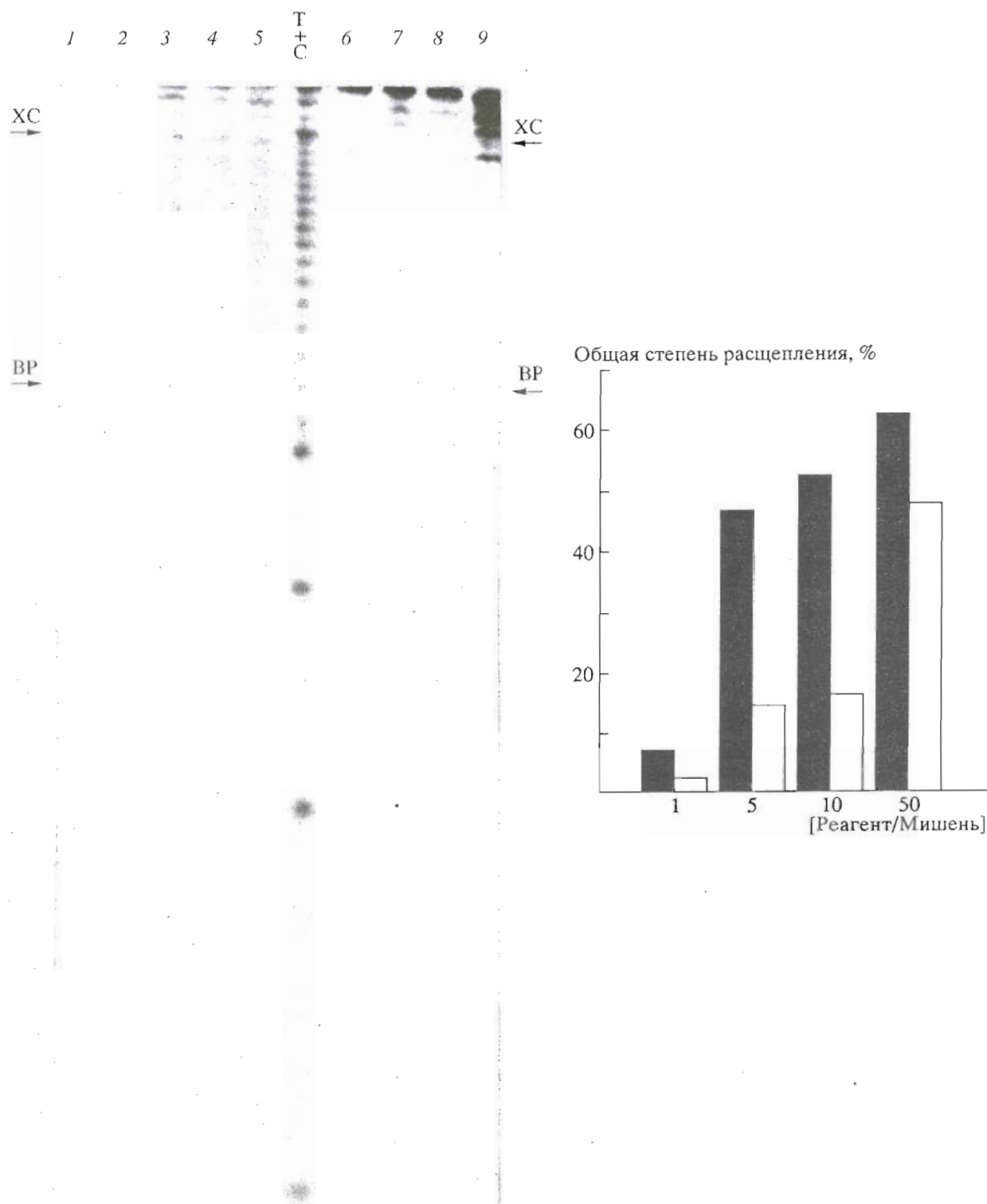


Рис. 3. Результаты электрофоретического анализа расщепления Т-богатой цепи двухцепочечной ДНК-мишени 5'-блеомициновыми производными гексадекатимидилата (2 - 5) и не образующего тройной комплекс олигонуклеотидного реагента (Blm-R) pCAGCGGGATGCAACAC при концентрациях 1 (2 и 6), 5 (3 и 7), 10 (4 и 8) и 50 мкМ (5 и 9). Концентрация ДНК-мишени – 1 мкМ, реакцию проводили при 20°C. Дорожка 1 – мишень без реагентов в условиях реакции. Справа приведены результаты количественного анализа общей степени расщепления при различных избытках реагентов. Темные и светлые столбики отвечают соответственно расщеплению ДНК-мишени 5'-блеомициновыми производными гексадекатимидилата и pCAGCGGGATGCAACAC .

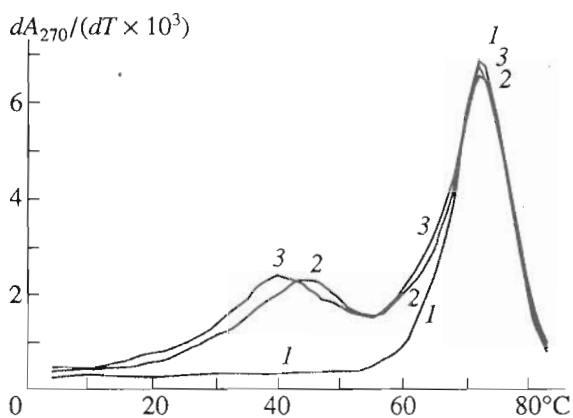


Рис. 4. Дифференциальные кривые термической денатурации 30-звенной двухцепочечной ДНК-мишени (1) и триплексов, образованных ДНК-мишенью с гексадекатимидилатом (2) и 5'-блеомициновым производным гексадекатимидилата (3) при концентрации компонентов 1 мкМ в буферном растворе 1 М LiCl, 0.1 М трис-HCl, 0.01 М MgCl₂ (pH 7.5).

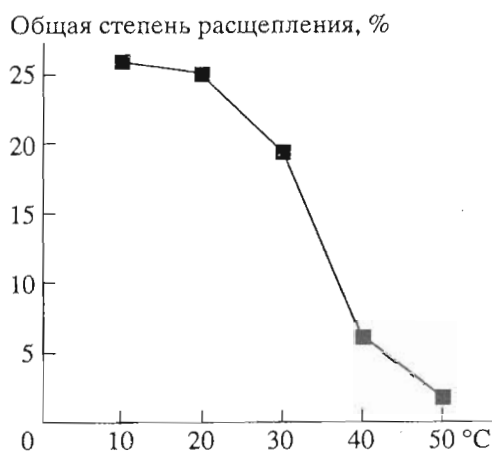


Рис. 5. Зависимость степени расщепления А-богатой цепи двухцепочечной ДНК-мишени (1 мкМ) 5'-блеомициновым производным гексадекатимидилата (5 мкМ) от температуры. Реакционные смеси анализировали в 20% денатурирующем ПААГ.

Сравнивая характер расщепления цепей в триплексах I и II (рис. 1, 2), нельзя не отметить протяженность участка расщепления Т-богатой цепи 5'-реагентом. Участок приблизительно равного по интенсивности расщепления охватывает 9 звеньев: с Т²³ по Т¹⁵. Наличие протяженного участка расщепления характерно для действия реагентов, генерирующих диффузные ОН⁻-радикалы, как было показано для EDTA-содержащих производных олигонуклеотидов, образующих двойной [26, 27] и тройной [28] комплексы с ДНК-мишенью. ОН⁻-радикалы вызывают повреждение главным образом оснований, а не дезоксирибозы [29]. Обработка пиперидином такой ДНК ведет к расщеплению цепи в местах щелочлабильных модификаций с образованием 3'-фосфата в точке разрыва.

Такое расщепление можно отличить от разрывов, образуемых блеомицином. Блеомицин, связываясь с ДНК в малой бороздке, вызывает селективное окисление по 4'-положению дезоксирибозы. Последующие превращения ведут либо к прямому разрыву цепи с образованием 3'-фосфогликолята, либо к формированию щелочлабильного сайта. Обработка последнего пиперидином ведет также к разрыву цепи с образованием 3'-фосфата [30]. 5'-Меченые продукты расщепления ДНК блеомицином при разделении в ПААГ дают две близкорасположенные полосы, соответствующие этим двум типам продуктов [20, 31], причем продукт с 3'-фосфогликолятом обладает большей электрофоретической подвижностью, чем продукт с 3'-фосфатом.

Подобное двоение полос при анализе в ПААГ наблюдалось при деструкции ДНК-мишени блеомицином и блеомициновыми производными оли-

гонуклеотидов в дуплексе [14, 16]. При достаточном разделении в ПААГ продуктов расщепления пиримидинбогатой цепи 5'-блеомициновым производным гексадекатимидилата (рис. б) становится явным, что расщепление по каждому нуклеотидному звену дает смесь продуктов, которые проявляются как две близкорасположенные полосы приблизительно равной интенсивности, причем верхняя полоса совпадает по подвижности с маркерным расщеплением по Максаму-Гилберту. Подобное "двоение" полос наблюдается также при анализе в ПААГ для продуктов расщепления А-цепи 5'-реагентом и Т-цепи 3'-реагентом (рис. 2, дорожки 2 и 7). Таким образом, для свободного антибиотика и блеомициновых производных олигонуклеотидов, образующих тройной комплекс, картины расщепления по нуклеотидному звену совпадают. Это указывает на то, что расщепление ДНК блеомициновыми производными олигонуклеотидов в тройном комплексе не связано с генерированием диффузных ОН⁻-радикалов и протекает, по-видимому, по механизму, характерному для расщепления ДНК свободным антибиотиком.

Из представленных результатов следует, что блеомициновые производные гексадекатимидилата способны формировать тройные комплексы и вызывать сайт-специфическую деструкцию ДНК-мишени с образованием как достаточно узких, так и протяженных участков расщепления. В случае 3'-реагента регистрируется расщепление А- и Т-богатых цепей вблизи расположения остатка блеомицина (рис. 1, 2, триплекс II). При действии 5'-реагента А-богатая цепь расщепляется преимущественно по А⁸-положению (48% общего расщепления), а Т-богатая цепь деструктурируется

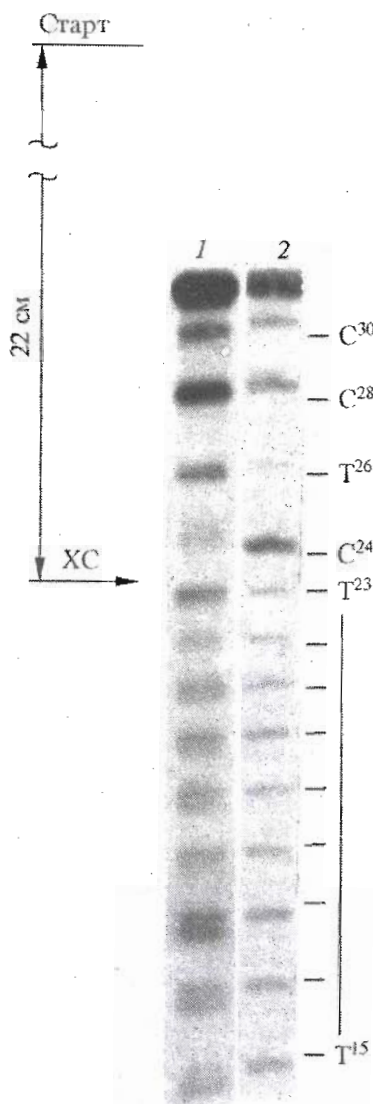


Рис. 6. Продукты расщепления Т-цепи 5'-блеомициновым реагентом (1) и маркерное расщепление по Максему-Гилберту (2) при увеличенном пробеге в 20% ПААГ. Условия расщепления такие же, как в подписи к рис. 2.

по протяженному участку $T^{13}-C^{24}$ (триплекс I). Имеющихся данных пока недостаточно для объяснения характера расщепления Т-богатой цепи 5'-реагентом, и требуются дополнительные исследования для более определенных заключений.

Одним из направлений развития исследований может стать оптимизация взаимодействия антибиотика с ДНК путем введения спейсера, соединяющего олигонуклеотид и блеомицин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: гидрохлорид блеомицина A_5 (95% основного вещества) производства опытного завода Института органичес-

кого синтеза (Рига, Латвия); олигонуклеотиды $GCGCACGA_{16}GTCGAGG$, $CCTCGACT_{16}CGTGCGC$, T_{16p} , синтезированные фосфитамидным методом [33] на автоматическом синтезаторе "Виктория-6М". Олигонуклеотиды pT_{16} и $pCAGCGGGATGCAACAC$, синтезированные модифицированным триэфирным методом [34], были любезно предоставлены Е.М. Ивановой и И.Г. Шишкиной (НИБХ СО РАН).

Синтез и выделение блеомициновых производных олигонуклеотидов (Blm-R) pT_{16} , T_{16p} (R-Blm) и (Blm-R) $pCAGCGGGATGCAACAC$ проводили по методике, описанной в работе [14].

Концентрации олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически на приборе Specord M40 (Carl Zeiss, Jena) в буферном растворе 0.2 М LiCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.5), используя молярные коэффициенты поглощения (ϵ_{260} , $M^{-1} cm^{-1}$) 327800 (для $GCGCACGA_{16}GTCGAGG$), 249000 (для $CCTCGACT_{16}CGTGCGC$), 130200 (для T_{16p} и pT_{16}), 156400 (для $pCAGCGGGATGCAACAC$), вычисленные по методике [35]. Значения ϵ_{260} ($M^{-1} cm^{-1}$) блеомициновых производных гексадекатимидилата (146200) и $pCAGCGGGATGCAACAC$ (172400) вычисляли как сумму молярных коэффициентов поглощения антибиотика [36] и олигонуклеотида.

Температуру плавления двухцепочечной ДНК-мишеней и триплексов, образованных с ней гексадекатимидилатом и блеомициновым производным гексадекатимидилата, определяли на спектрофотометре Specord M40 в термостатированной кварцевой кювете объемом 2 мл (рис. 4). Скорость нагрева образца составляла 0.1 град $мин^{-1}$ [37].

Электрофоретическое разделение продуктов расщепления проводили в 20% ПААГ в денатурирующих условиях (8 М мочевины, 0.09 М трис-борат, pH 8.3, 40°C). Результаты анализа визуализировали радиоавтографией на пленку РМ-В при -50°C. Количественные характеристики расщепления получали с помощью лазерного денситометра Ultrascan XL (ЛКВ).

^{32}P -Меченые олигонуклеотиды получали по методике [38], используя $[\gamma-^{32}P]ATP$ (3000 Ки/ммоль) и T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и очищали электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ.

Статистическое расщепление цепи по остаткам пуринов или пиримидинов проводили по Максему-Гилберту [39].

Деграция двухцепочечной ДНК-мишени блеомициновыми производными олигонуклеотидов. Реакционные смеси объемом 30 мкл, содержащие 1 мкМ мишень и 5 мкМ (кроме экспериментов, представленных на рис. 2) олигонуклеотидный реагент, инкубировали при 4°C до прекращения падения оптического поглощения вследствие формирования тройного комплекса в

буферном растворе, содержащем 1 М LiCl, 0.1 М трис-HCl (pH 7.5) и 0.01 М MgCl₂. Для инициации расщепления в реакционную смесь добавляли Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O (до 1 × 10⁻⁴ М) и 2-меркаптоэтанол (до 0.05 М) и инкубировали реакционную смесь 6 ч при заданной температуре. После реакции нуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне, обрабатывали 10% пиперидином (95°C, 30 мин) и анализировали гелем электрофорезом.

Авторы выражают благодарность А.В. Лебедеву за активное участие в обсуждении результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helene C. // Current Opinion in Biotechnol. 1993. V. 4. № 1. P. 29 - 36.
2. Fedorova O.S., Knorre D.G., Podust L.M., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1988. V. 228. № 2. P. 273 - 276.
3. Povsic T.J., Strobel S.A., Dervan P.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1992. V. 114. № 15. P. 5941 - 5945.
4. Le Doan T., Perrouault L., Praseuth D., Nabhouh N., Decout J.-L., Thuong N.T., Lhomme J., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 19. P. 7749 - 7760.
5. Takasugi M., Cuendouz A., Chassignol M., Decout J.-L., Lhomme J., Thuong N.T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 15. P. 5602 - 5606.
6. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Лохов С.Г. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. № 1. С. 30 - 39.
7. Moser H.E., Dervan P.B. // Science. 1987. V. 238. № 4827. P. 645 - 650.
8. Francois J.-C., Saison-Behmoaras T., Chassignol M., Thuong N.T., Helene C. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 10. P. 5891 - 5898.
9. Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects // Ed. Hecht S.M. N.Y.: Springer-Verlag, 1979.
10. Hecht S.M. // Accounts Chem. Res. 1986. V. 19. № 12. P. 383 - 391.
11. Suzuki H., Nagai K., Yamaki H., Tanaka N., Umezawa H. // J. Antibiot. 1969. V. 22. № 9. P. 446 - 448.
12. Povirk L.F. // Molecular Aspects of Anti-cancer Drug Action / Eds Neidle S., Waring M. L.: Macmillan Press, 1983. P. 157 - 181.
13. Steighner R.J., Povirk L.F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 11. P. 8350 - 8354.
14. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Сергеев Д.С. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 9. С. 1193 - 1200.
15. Sergeev D.S., Zarytova V.F., Mamaev S.V., Godovikova T.S., Vlassov V.V. // Antisense Res. Dev. 1992. V. 2. № 10. P. 235 - 241.
16. Zarytova V.F., Sergeev D.S., Godovikova T.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. № 3. P. 189 - 193.
17. Sausville E.A., Stein R., Peisach J., Horwitz S.B. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 14. P. 2746 - 2754.
18. Arnott S., Selsing E. // J. Mol. Biol. 1974. V. 88. № 2. P. 509 - 521.
19. Pilch D.S., Levenson C., Shafer R.H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 5. P. 1942 - 1946.
20. D'Andrea A.D., Haseltine W.A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 8. P. 3608 - 3612.
21. Murray V., Martin R.F. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 5. P. 1467 - 1481.
22. Nightingale K.P., Fox K.R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 11. P. 2549 - 2555.
23. Chien M., Grollman A.P., Horwitz S.B. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 16. P. 3641 - 3647.
24. Kuwahara J., Sugiura Y. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 8. P. 2459 - 2463.
25. Hertzberg R.P., Caranfa M.J., Hecht S.M. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 9. P. 3164 - 3174.
26. Chu B.C.F., Orgel L.E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 963 - 967.
27. Бросалина Е.Б., Власов В.В., Казаков С.А. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 125 - 128.
28. Griffin L.C., Dervan P.B. // Science. 1989. V. 245. № 4921. P. 967 - 971.
29. Кнорре Д.Г., Федорова О.С., Фролова Е.И. // Успехи химии. 1993. Т. 62. № 1. С. 70 - 91.
30. Stubbe J., Kozarich J.W. // Chem. Rev. 1987. V. 87. № 5. P. 1107 - 1136.
31. Kross J., Henner D.W., Hecht S.M., Haseltine W.A. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 18. P. 4310 - 4318.
32. Francois J.-C., Saison-Behmoaras T., Barbier C., Chassignol M., Thuong N.T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 24. P. 9702 - 9706.
33. Грязнов С.М., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Кумарев В.П., Левина А.С., Полищук А.С., Потапов В.К., Потемкин Г.А., Сердин Ю.Г., Шабарова З.А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1987. Вып. 1. № 2. С. 119 - 123.
34. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516 - 521.
35. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65 - 77.
36. Sugiura Y., Ishizu K., Miyoshi K. // J. Antibiot. 1979. V. 32. № 5. P. 453 - 461.
37. Rougee M., Faucon B., Mergny J.L., Barcelo F., Giovannangeli C., Garestier T., Helene C. // Biochemistry. 1992. V. 31. № 38. P. 9269 - 9278.
38. Мазин А.В. // Методы молекулярной генетики и геномной инженерии / Ред. Салганик Р.И. Новосибирск: Наука, 1990. С. 25 - 29.
39. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499 - 560.

Cleavage of Double-Strand DNA by Bleomycin Derivatives of Oligonucleotides Forming a Ternary Complex

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

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – Hexadecathymidylate derivatives, containing covalently-bound antitumor antibiotic bleomycin A₅, were shown to form a triple-helix complex with double-strand 30-bp DNA-target and to carry out within this complex complementary-addressed DNA modification. Fivefold excess of reagent in relation to target leads to non-specific cleavage mainly of pyrimidine-rich DNA strand. Total degrees of the target-strand cleavage by 5'- and 3'-bleomycin derivatives of hexadecathymidylate were 25 and 35% for purine-rich strand and 47 and 36% for pyrimidine-rich strand. Degrees of non-specific cleavage by 5'-bleomycin derivative of hexadecanucleotide that does not form triple-helix were 6 and 16% for purine- and pyrimidine-rich strands, respectively. Comparison of these data has shown that site-specific cleavage prevailed nonspecific one. Triplex of 5'-bleomycin derivative with DNA melted by 5°C lower (m.p. 40°C) than the similar triplex of hexadecathymidylate. Temperature lowering from 50 to 20°C increases the DNA-cleavage degree according to the increase in the part of target molecules involved in triple-helix formation.

Key words: triple-helix complex, bleomycin, oligonucleotides, site-specific DNA destruction.

* To whom correspondence should be addressed.