



УДК 577.113(4+7)+547.92

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ.

I. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЭФФЕКТОРОВ НА АЛКИЛИРОВАНИЕ ДНК-МИШЕНЕЙ

© 1995 г. Д. В. Пышный, И. А. Пышная, С. Г. Лохов,
Е. М. Иванова, В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Поступила в редакцию 02.11.94 г.

Показано, что тандем производных коротких олигонуклеотидов эффективно и сайт-специфично взаимодействует с 20-звенным дезоксирибонуклеотидом-мишенью (М). Продемонстрировано, что крайне низкие гибридационные свойства тетра nukлеотида (D) и его 3'-холестеринового и 3'-эстронового эфиров (D-ChS и D-EsS соответственно) существенно возрастают в присутствии фланкирующих их на цепи мишени эффекторов: октануклеотидов (E_1 и E_2), их 5',3'-дифеназиниевых (Phn- E_1 -Phn и Phn- E_2 -Phn) и 5'-холестерил-3'-феназиниевых (ChS- E_1 -Phn и ChS- E_2 -Phn) производных. Степень влияния эффекторов на взаимодействие мишени М с тетра nukлеотидом D или его алкилирующим производным (RCl-D) увеличивается в ряду $E_1 + E_2 < \text{ChS-}E_1\text{-Phn} + \text{ChS-}E_2\text{-Phn} < \text{Phn-}E_1\text{-Phn} + \text{Phn-}E_2\text{-Phn}$, а со стероидными производными D-ChS и D-EsS и реагентами на их основе (RCl-D-ChS, RCl-D-EsS) – в ряду $E_1 + E_2 < \text{Phn-}E_1\text{-Phn} + \text{Phn-}E_2\text{-Phn} < \text{ChS-}E_1\text{-Phn} + \text{ChS-}E_2\text{-Phn}$. Степень модификации мишени М производным RCl-D-EsS в присутствии ChS- E_1 -Phn и ChS- E_2 -Phn достигает 40% даже при 37°C в условиях, близких к физиологическим. Продемонстрирована возможность использования 5'-холестерил-3'-феназинийсодержащих олигонуклеотидов как эффекторов взаимодействия ДНК-мишени с производными коротких олигонуклеотидов.

Ключевые слова: производные олигонуклеотидов, эффекторы, модификация ДНК, термостабильность дуплексов.

Эффективность сайт-специфического взаимодействия олигонуклеотидов и их производных с нуклеиновыми кислотами во многом определяется стабильностью их комплементарных комплексов, которая возрастает с увеличением количества звеньев в олигонуклеотидной цепи. Однако с ростом длины олигонуклеотида растет и вероятность образования несовершенных, но достаточно прочных дуплексов. В системах *in vitro* такие дуплексы могут быть разрушены специальными приемами, например отжигом. Иная ситуация возникает в системах *in vivo*, в которых существенные изменения условий неприемлемы. В этом случае образование несовершенных комплексов протяженных олигонуклеотидов и клеточных нуклеиновых кислот с $T_m > 37^\circ\text{C}$ должно уменьшать специфичность действия олигонуклеотидных реагентов. Использование коротких олиго-

нуклеотидов и их производных также сопряжено с рядом трудностей. Уменьшение длины олигонуклеотида приводит к увеличению числа возможных участков комплементарного связывания с нуклеиновыми кислотами и снижению его комплексообразующей способности. И хотя производные коротких олигонуклеотидов не образуют несовершенные комплексы с НК при 37°C, их воздействие на НК-мишени малоэффективно. Поэтому разработка подходов, позволяющих повысить эффективность специфического воздействия олигонуклеотидов и их производных на НК в условиях, близких к физиологическим, продолжает оставаться актуальной задачей. Недавно нами был предложен подход, существенно повышающий эффективность и селективность действия алкилирующих производных коротких олигонуклеотидов на ДНК-мишень в одном из нескольких возможных участков связывания [1 - 3]. Подход основан на использовании тандема модифицированных коротких олигонуклеотидов: реагента и эффекторов – моно- и дифеназиниевых производных, стабилизирующих комплексы

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты, ChS-OH – холестерин, EsS-OH – эстрон, Phn – N-(2-гидроксиэтил)феназиний, RCl – 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламинобензилметиламин). Префикс "d" в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

олигонуклеотидной части реагента с мишенью. Эффективное действие таких тандемов проявляется только в тех участках НК, где используемые реагенты на основе коротких олигонуклеотидов имеют непрерывный сайт узнавания мишени. Поэтому, используя олигонуклеотид-эффектор с определенной последовательностью, можно направить олигонуклеотид-реагент в один выбранный участок НК-мишени, комплементарный используемому тандему. Наличие других индивидуальных участков связывания используемых коротких олигонуклеотидов – либо реагента, либо эффектора – практически не влияет на степень и специфичность действия из-за низкой стабильности образующихся комплексов [1 - 3].

На примере модификации 302-звенного одноцепочечного фрагмента ДНК [4] было продемонстрировано, что в рамках этого подхода даже производные тетрануклеотидов способны высокоспецифично и эффективно воздействовать на мишень. Модификация мишени алкилирующим производным тетрануклеотида, имеющим несколько комплементарных сайтов на ДНК, оказалась высокоэффективной и избирательной лишь в одном сайте узнавания, если ее осуществ-

ляли в присутствии дифеназиниевых производных олигонуклеотидов, последовательность оснований которых была выбрана таким образом, что они фланкировали реагент при образовании комплементарного комплекса на цепи мишени в выбранном участке.

Для того чтобы такой набор олигонуклеотидных реагентов мог эффективно действовать на НК внутри клетки, необходимо повысить способность его компонентов проникать через клеточную мембрану, что может быть достигнуто введением в олигонуклеотиды остатков стероидов [5, 6]. Однако введение в олигонуклеотид-эффектор объемной гидрофобной группировки может изменить его свойства как "помощника" модификации.

Целью данной работы было исследование влияния различных типов эффекторов – октануклеотидов, их 3',5'-дифеназиниевых и 3'-феназиний-5'-холестериновых производных – на стабильность дуплексов, образованных ДНК-мишенью и тетрануклеотидом или его стероидными производными, а также на степень модификации ДНК-фрагмента алкилирующими реагентами на их основе.

Исследование проводили на модельной системе (схема), используя в качестве ДНК-мишени

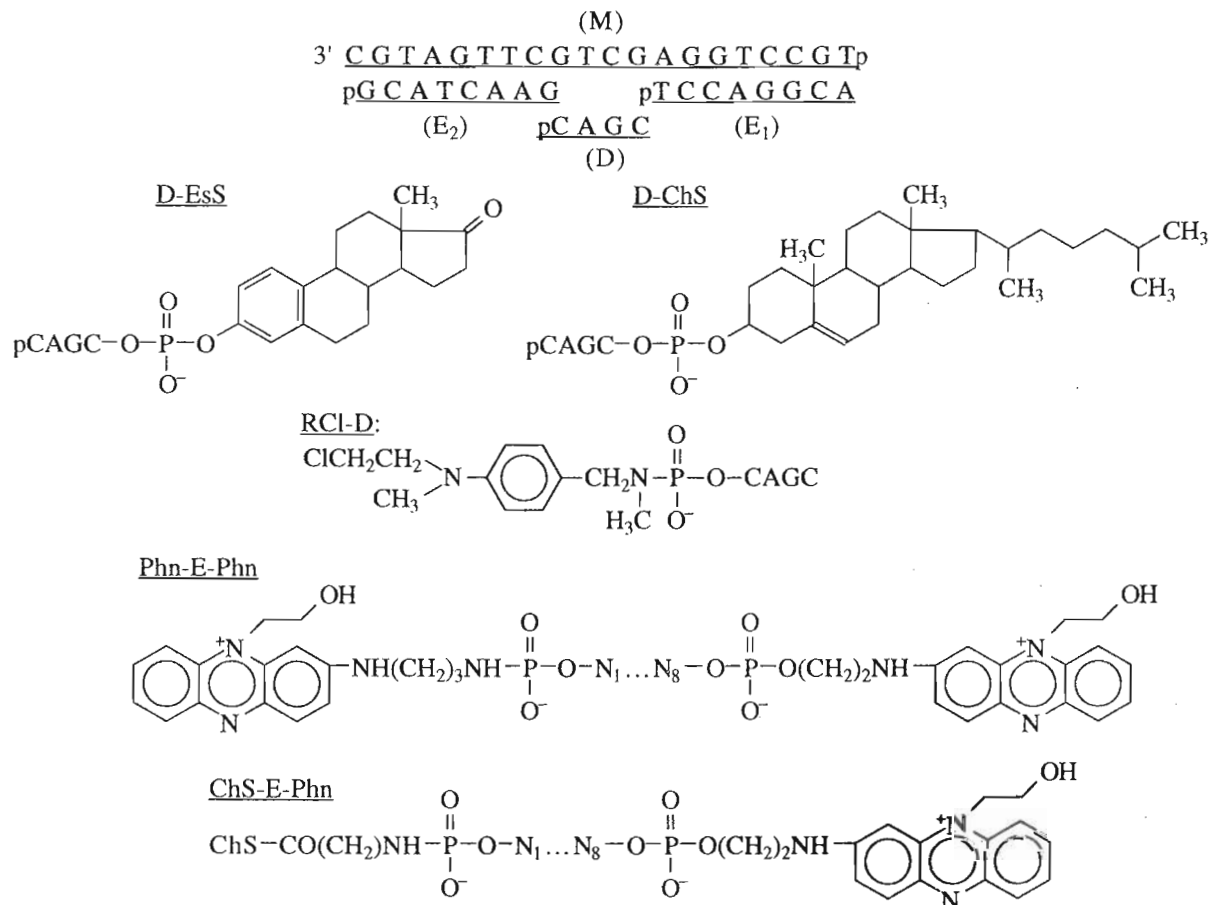


Схема.

одноцепочечный 20-звенный олигодезоксирибонуклеотид М и комплементарный ему тетра nukлеотид D или его стероидные производные, содержащие на 3'-концевом фосфате остаток холестерина или эстрогена (D-ChS и D-EsS соответственно), а также их реакционноспособные производные RCl-D, RCl-D-ChS, RCl-D-EsS, содержащие на 5'-концевом фосфате алкилирующую группировку – 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламин (RCl).

Выбор стероидов – холестерина и эстрогена – основан на том, что они имеют существенные различия в структуре и гидрофобности и введение их в олигонуклеотид, содержащий реакционноспособную группировку, может по-разному сказываться на способности реагента модифицировать мишень. В качестве эффекторов использовали октануклеотиды (E₁ и E₂), их 5',3'-дифеназиниевые производные (Phn-E₁-Phn и Phn-E₂-Phn) и 5'-холестерил-3'-феназиний-октануклеотиды (ChS-E₁-Phn и ChS-E₂-Phn), которые фланкировали тетра nukлеотид D при образовании дуплекса с ДНК-мишенью.

Исследование термической стабильности дуплексов проводили в буфере, содержащем 0.1 M NaCl, 0.01 M какодилат натрия (pH 7.4), 1 mM EDTA, при концентрации всех олигонуклеотидных компонентов 1.3×10^{-5} M. Модификацию ³²P-меченого 20-звенного олигонуклеотида М алкилирующими производными проводили в буфере 0.1 M NaCl, 0.01 M трис-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA при 37°C. Продукты модификации мишени после их обработки пиперидином регистрировали с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ.

На первом этапе работы было рассмотрено влияние трех типов эффекторов – E₁ + E₂, Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn, ChS-E₁-Phn + ChS-E₂-Phn – на взаимодействие мишени М с тетра nukлеотидом D, не содержащим остаток стероида, и его алкилирующим производным RCl-D.

Предварительно было проведено сравнение комплексообразующих свойств эффекторов – октануклеотидов и их производных. Октануклеотиды E₁ и E₂ (и их производные) при образовании комплементарных комплексов с ДНК-мишенью образуют две независимые дуплексные структуры, разделенные четырьмя нуклеотидными звеньями. Дифференциальные кривые термической денатурации комплексов мишени с октануклеотидами (или их производными) имеют практически один максимум, температура достижения которого принята нами за температуру плавления дуплекса мишень – “эффекторная” пара (например, рис. 1, кривая 1).

Согласно табл. 1, октануклеотиды E₁ и E₂ образуют с мишенью М комплекс с T_{пл} 35°C (комплекс 1). Введение в октануклеотиды по 5',3'-концевым фосфатам двух остатков феназиния приводит к значительной стабилизации их комплекса

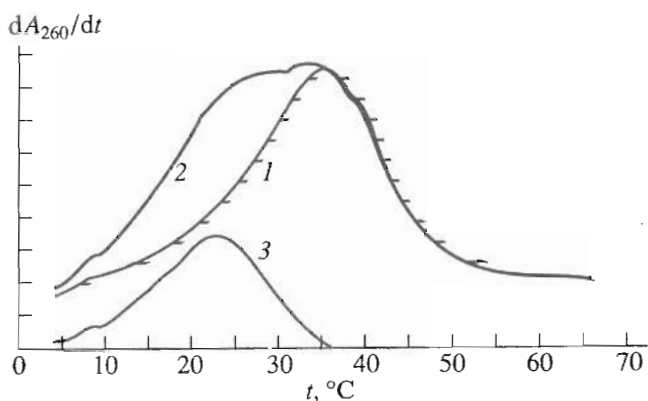


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления комплексов, образованных ДНК-мишенью М с октануклеотидами E₁ и E₂ (1), с тетра nukлеотидом D и октануклеотидами E₁ + E₂ (2), тетра nukлеотида D в присутствии октануклеотидов E₁ + E₂ (расчетная, 3) в 0.1 M NaCl, 0.01 M растворе какодилата натрия (pH 7.4), 1 mM EDTA при концентрации всех олигонуклеотидных компонентов 1.3×10^{-5} M.

с ДНК-мишенью (комплекс 2, ΔT_{пл} 20°C), что находится в соответствии с данными работы [7]. В то же время комплекс мишени М с октануклеотидными производными, содержащими остатки холестерина и феназиния, ChS-E₁-Phn и ChS-E₂-Phn (комплекс 3), имеет промежуточную T_{пл} 47°C.

Тетра nukлеотид D и его стероидные производные D-ChS и D-EsS обладают крайне низкими комплексообразующими свойствами. Дифференциальные кривые термической денатурации их смеси с эйкозануклеотидом М совпадают с таковой самого эйкозануклеотида, образующего слабые дуплексные структуры с T_{пл} 7°C. Однако в присутствии эффекторов стабильность комплекса тетра nukлеотида (и его стероидных производных) с ДНК-мишенью существенно возрастает и находится в зависимости от типа используемых эффекторов. На рис. 1 приведены экспериментальные дифференциальные кривые плавления комплексов М + E₁ + E₂ и М + E₁ + D + E₂ и рассчитанная из них по разнице дифференциальная кривая термической денатурации комплекса, образованного тетра nukлеотидом и мишенью в присутствии октануклеотидов. Температура (23°C),

Таблица 1. Температуры плавления комплексов, образованных мишенью М и парами эффекторов

Комплекс	Эффектор		T _{пл} , °C
1	E ₂	E ₁	35
2	Phn-E ₂ -Phn	Phn-E ₁ -Phn	55
3	ChS-E ₂ -Phn	ChS-E ₁ -Phn	47

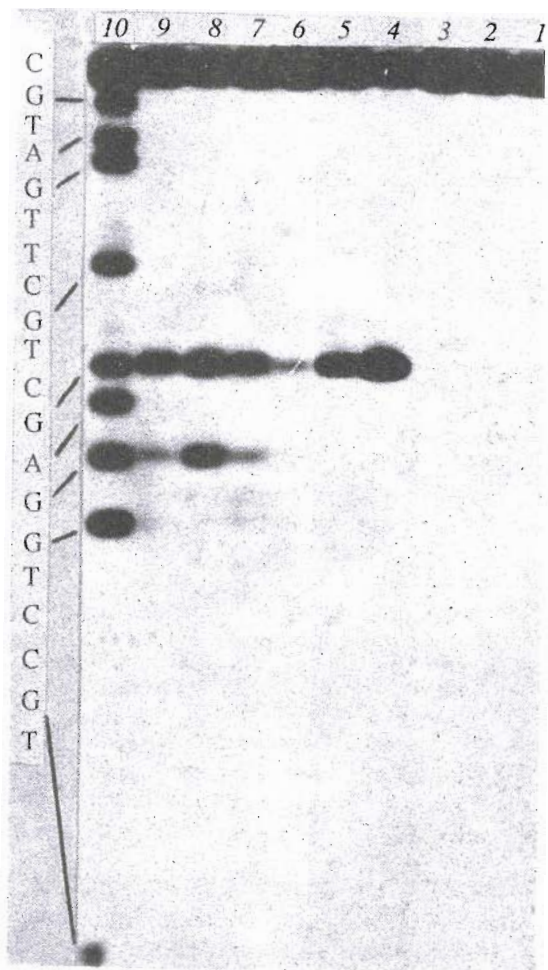
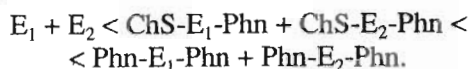


Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов модификации ^{32}P -меченой ДНК-мишени после пиперидиновой обработки алкилирующим реагентом на основе тетра nukлеотида RCl-D (1 – в отсутствие эффекторов, 4 – в составе комплекса 5б, 7 – в составе комплекса 6б), алкилирующим реагентом на основе эстронового производного RCl-D-EsS (2 – в отсутствие эффекторов, 5 – в составе комплекса 11б, 8 – в составе комплекса 12б), алкилирующим реагентом на основе холестеринного производного RCl-D-ChS (3 – в отсутствие эффекторов, 6 – в составе комплекса 8б, 9 – в составе комплекса 9б). 10 – статистическое расщепление ДНК-мишени по остаткам пуринов. Условия модификации: 0.1 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.2), 1 мМ EDTA; 37°C, 8 ч; [M] = 5×10^{-7} М, [реагент] = [эффектор] = 1×10^{-5} М.

при которой расчетная кривая достигала максимального значения, принималась за температуру плавления дуплекса M + D в присутствии октануклеотидов (комплекс 4а). Аналогично определялась температура плавления комплексов, образованных мишенью с тетра nukлеотидом или его стероидными производными в присутствии всех типов эффекторов.

Как видно из табл. 2, в присутствии дифеназиниевых эффекторов Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn тетра nukлеотид D образует с мишенью самый прочный комплекс ($T_{\text{пл}}$ 38°C, комплекс 5а), а замена дифеназиниевых эффекторов на холестерилсодержащие ChS-E₁-Phn + ChS-E₂-Phn приводит к образованию более слабого комплекса ($\Delta T_{\text{пл}}$ 7°C, комплекс 6а).

Таким образом, стабильность комплекса M + D находится в прямой зависимости от гибридизационных свойств октануклеотидов и их производных и увеличивается в ряду эффекторов:



Такая закономерность влияния эффекторов оказывается характерной и для модификации ДНК-мишени алкилирующим производным на основе тетра nukлеотида RCl-D (табл. 2). В отсутствие эффекторов реагент RCl-D не модифицирует мишень M (рис. 2). Использование в качестве эффекторов пары октануклеотидов E₁ + E₂ (комплекс 4б) приводит к модификации мишени в следовых количествах, очевидно, из-за того, что при 37°C концентрация дуплекса M + RCl-D крайне мала. В присутствии дифеназиниевых эффекторов Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn (комплекс 5б) степень модификации мишени M была максимальной и достигала 44%, причем алкилированию подвергалось практически одно основание мишени – G9 (рис. 2). Замена дифеназиниевых эффекторов на холестерилсодержащие ChS-E₁-Phn + ChS-E₂-Phn (комплекс 6б) приводит к уменьшению степени модификации и изменению сайта модификации: наряду с G9 (20%) алкилирование мишени протекает и по основанию G7 (5%). Падение эффективности модификации в этом случае, очевидно, обусловлено меньшей стабильностью комплекса M + D в присутствии этих эффекторов (комплекс 6а).

На следующем этапе работы была исследована термическая денатурация комплекса холестерилсодержащего тетра nukлеотида с мишенью (M + D-ChS) в присутствии пар октануклеотидов и их производных.

Как видно из табл. 3, влияние различных типов эффекторов на стабилизацию комплекса M + D-ChS (в отличие от рассмотренного выше комплекса мишени с тетра nukлеотидом M + D) не коррелирует напрямую с их гибридизационными свойствами.

Октануклеотиды E₁ + E₂ оказывают самое слабое влияние на стабильность комплекса M + D-ChS (комплекс 7а). В присутствии дифеназиниевых эффекторов Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn температура плавления дуплекса M + D-ChS (комплекс 8а) существенно возрастает (на 15°C) по сравнению с использованием октануклеотидов, как это

Таблица 2. Температуры плавления дуплексов M + D, предельная степень (n) и сайт алкилирования мишени M реагентом RCl-D в составе комплексов

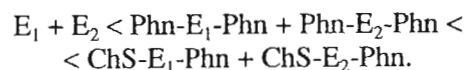
Комплекс	Эффектор	M		$T_{пл}, ^\circ\text{C}$ M + D	n, % сайт
		3' эффекттор	5' эффекттор		
M + D	–	D	–	<7	–
M + RCl-D	–	RCl-D	–	–	0
4a	E ₂	D	E ₁	23	–
4б	E ₂	RCl-D	E ₁	–	5 (G9)
5a	Phn-E ₂ -Phn	D	Phn-E ₁ -Phn	38	–
5б	Phn-E ₂ -Phn	RCl-D	Phn-E ₁ -Phn	–	44 (G9)
6a	ChS-E ₂ -Phn	D	ChS-E ₁ -Phn	31	–
6б	ChS-E ₂ -Phn	RCl-D	ChS-E ₁ -Phn	–	20 (G9) 5 (G7)

Таблица 3. Температуры плавления дуплексов M + D-ChS, предельная степень (n) и сайт алкилирования мишени M реагентом RCl-D-ChS в составе комплексов:

Комплекс	Эффектор	M		$T_{пл}, ^\circ\text{C}$ M + D-ChS	n, % сайт
		3' эффекттор	5' эффекттор		
M + D-ChS	–	D-ChS	–	<7	–
M + RCl-D-ChS	–	RCl-D-ChS	–	–	0
7a	E ₂	D-ChS	E ₁	17	–
7б	E ₂	RCl-D-ChS	E ₁	–	0
8a	Phn-E ₂ -Phn	D-ChS	Phn-E ₁ -Phn	32	–
8б	Phn-E ₂ -Phn	RCl-D-ChS	Phn-E ₁ -Phn	–	6 (G9)
9a	ChS-E ₂ -Phn	D-ChS	ChS-E ₁ -Phn	43	–
9б	ChS-E ₂ -Phn	RCl-D-ChS	ChS-E ₁ -Phn	–	13 (G9) 3 (G7)

наблюдалось и для комплекса 5a (M + D). Однако использование холестерилсодержащих эффекторов ChS-E₁-Phn и ChS-E₂-Phn приводит не к уменьшению, а к дальнейшему повышению температуры плавления комплекса M + D-ChS (на 11°C, комплекс 9a), до значений, приближающихся к температуре плавления самих эффекторов. Столь существенная стабилизация дуплекса может быть обусловлена гидрофобными взаимодействиями между холестериновыми остатками производного тетрануклеотида D-ChS и эффектора ChS-E₁-Phn, сближающимися при образовании комплекса. Подобная стабилизация олигонуклеотидных комплексов, содержащих остатки холестерина, хотя и в значительно меньшей степени, наблюдалась ранее в работах [8, 9].

Таким образом, в случае холестерилсодержащего тетрануклеотида D-ChS влияние эффекторов на стабильность его комплекса с мишенью увеличивается в ряду:



В соответствии с полученными термическими характеристиками можно было бы ожидать и эффективной модификации ДНК-мишени алкилирующим производным RCl-D-ChS в присутствии как Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn, так и ChS-E₁-Phn + ChS-E₂-Phn. Однако модификация мишени холестерилсодержащим реагентом RCl-D-ChS оказалась малоэффективной, хотя закономерность влияния эффекторов на модификацию не изменилась

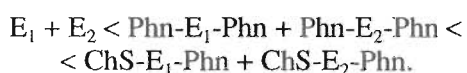
Таблица 4. Температуры плавления дуплексов M + D-EsS, предельная степень (n) и сайт алкилирования мишени M реагентом RCl-D-EsS в составе комплексов: $\frac{3'}{\text{эффектор D-EsS/RCl-D-EsS}}$ M $\frac{5'}{\text{эффектор}}$

Комплекс	Эффектор	D-EsS/RCl-D-EsS	Эффектор	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$ M + D-EsS	n, % сайт
D-EsS	–	D-EsS	–	<7	–
RCl-D-EsS	–	RCl-D-EsS	–	–	0
10a	E ₂	D-EsS	E ₁	20	–
10б	E ₂	RCl-D-EsS	E ₁	–	0
11a	Phn-E ₂ -Phn	D-EsS	Phn-E ₁ -Phn	35	–
11б	Phn-E ₂ -Phn	RCl-D-EsS	Phn-E ₁ -Phn	–	20 (G9)
12a	ChS-E ₂ -Phn	D-EsS	ChS-E ₁ -Phn	43	–
12б	ChS-E ₂ -Phn	RCl-D-EsS	ChS-E ₁ -Phn	–	25 (G9) 15 (G7)

(табл. 3, рис. 2). При использовании дифеназиниевых эффекторов Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn степень модификации составляла 6% (комплекс 8б), а в случае холестерилсодержащих ChS-E₁-Phn и ChS-E₂-Phn (комплекс 9б) достигала максимального значения – 16%. По-видимому, такая низкая реакционная способность RCl-D-ChS при наличии прочного комплекса с мишенью может быть обусловлена стерическими затруднениями, вызываемыми объемным остатком холестерина, и его дополнительными гидрофобными взаимодействиями с гетероциклическими основаниями в дуплексе, маскирующими их от действия алкилирующей группировки.

Другой использованный нами стероид – эстрон – не имеет в своей структуре алифатической цепи и поэтому обладает как меньшим объемом, так и более слабыми гидрофобными свойствами по сравнению с холестерином. На основании этого можно предположить, что введение его в тетра-нуклеотидный реагент не скажется столь драматически на реакционной способности последнего.

Исследование температуры плавления дуплекса M + D-EsS (табл. 4) в присутствии октануклеотидов и их производных показало, что стабильность этого комплекса зависит от типа исследуемых эффекторов так же, как и стабильность комплекса M + D-ChS, и увеличивается в ряду эффекторов:



Согласно табл. 4, самый стабильный комплекс M + D-EsS образуется, как и в случае холестеринового производного тетра-нуклеотида, в присутствии эффекторов ChS-E₁-Phn + ChS-E₂-Phn (комплекс 12а).

Модификация мишени алкилирующим производным RCl-D-EsS составляет 20% (G9) в присутствии дифеназиниевых эффекторов Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn (комплекс 11б) и существенно возрастает при использовании более гидрофобных эффекторов ChS-E₁-Phn + ChS-E₂-Phn – до 40% (25% – алкилирование по G7, 15% – по G9) (рис. 2). Очевидно, при замене остатка холестерина на остаток эстрона в реакционноспособном производном стероидсодержащего тетра-нуклеотида удается избежать пространственных затруднений, препятствующих модификации мишени, и сохранить гидрофобные взаимодействия, которые приводят к увеличению ее эффективности.

Таким образом, сравнение влияния рассмотренных эффекторов показало, что октануклеотиды E₁ + E₂ – наименее эффективные помощники взаимодействия производных тетра-нуклеотидов с ДНК-мишенью. Дифеназиниевые эффекторы Phn-E₁-Phn + Phn-E₂-Phn в наибольшей степени способствуют взаимодействию с мишенью тетра-нуклеотида и его алкилирующего производного, в то время как 5'-холестерил-3'-феназинийсодержащие эффекторы ChS-E₁-Phn + ChS-E₂-Phn оказывают максимальное влияние на взаимодействие ДНК-мишени с 3'-стероидсодержащими тетра-нуклеотидами и их алкилирующими группами. Способность 5'-холестерил-3'-феназинийсодержащих эффекторов значительно усиливать действие 3'-эстронсодержащего тетра-нуклеотида и его алкилирующего производного на ДНК-мишень даже при 37°C позволяет надеяться, что олигонуклеотидная система типа ChS-E₂-Phn + RCl-D-EsS + ChS-E₁-Phn может быть эффективной для воздействия на внутриклеточные НК, так как все ее компоненты сочетают в себе повышенную способность проникать в клетки и обладают высокой устойчивостью к действию нуклеаз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе, исходя из защищенных β -цианэтиловых-*n*-хлорфениловых эфиров 5'-нуклеотидов по [10].

$pCAGp(ChS)$ и $pCAGp(EsS)$ ($D-ChS$, $D-EsS$) получали в условиях фосфотриэфирного синтеза в растворе [11].

$pN_8p(Phn)$, $(Phn)pN_8p(Phn)$ получали по методике [12].

$ChS-CO(CH_2)_2NH-pN_8p(Phn)$ синтезировали из 3'-феназиниевых производных октануклеотидов [13].

а) $ChS-CO(CH_2)_2NH-Woc$. Навески $HOOC(CH_2)_2NH-Woc$ (2 ммоль) и холестерина (1 ммоль) растворяли в 10 мл абс. пиридина, добавляли триизопропилбензолсульфохлорид (3 ммоль) и *N*-метилимидазол (6 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 20°C. Продукт $ChS-CO(CH_2)_2NH-Woc$ выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте диэтилового эфира (0 - 50%) в гексане. *Woc*-защитную группировку удаляли обработкой трифторуксусной кислотой в течение 20 мин при 20°C. Полученный $ChS-CO(CH_2)_2NH_2$ выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте этилового спирта (0 - 50%) в хлороформе и кристаллизовали из этанола. Выход продукта составлял 63%.

б) $ChS-CO(CH_2)_2NH-pN_8p(Phn)$. 30 OE_{260} pN_8p-Phn в виде цетилтриметиламмониевой соли растворяли в 60 мкл диметилсульфоксида, добавляли 10 мг трифенилфосфина, 10 мг дипиридилдисульфида, 8 мкл *N*-метилимидазола. Реакционную смесь выдерживали 20 мин при 20°C, добавляли 2 мг $ChS-CO(CH_2)_2NH_2$ и 2 мкл триэтиламина. Полученную реакцию смесь выдерживали 60 мин при 20°C и выделяли продуктом обращенно-фазовой хроматографией в градиенте ацетонитрила (0 - 80%) в 0.05 М растворе $LiClO_4$. Целевой продукт осаждали добавлением 2% раствора $LiClO_4$ в ацетоне, осадок промывали ацетоном. Выход продукта составлял 70%.

$(RCI)pCAGC$, $(RCI)pCAGCp(ChS)$, $(RCI)pCAGCp(EsS)$ ($RCI-D$ и т.д.) получали и выделяли обращенно-фазовой хроматографией по методике [11]. Содержание активного хлора в тетра-нуклеотидных реагентах определяли по методике [14]; оно во всех случаях превышало 90%.

Концентрацию олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины ϵ_{260} моно- и динуклеотидов [15], алкилирующей группировки ($1.47 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ [16]), *N*-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка ($1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ [7]). Влияние стероидных остатков на ϵ_{260} олигонуклеотидных производных не учитывалось.

Исследование термической денатурации дуплексов проводили в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М какодилат натрия (pH 7.4), 1 mM EDTA при концентрации олигонуклеотидных компонентов, равной 1.3×10^{-5} М, на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милюхром" (Россия) на длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7 - 1°C/мин.

Модификацию 20-звенного олигонуклеотида М алкилирующими производными олигонуклеотидов RCl-D, RCl-D-ChS и RCl-D-EsS осуществляли в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA при 37°C в течение 8 ч (более пяти периодов полуионизации связи C-Cl [16]). 5'- ^{32}P -Меченый олигонуклеотид М получали путем обмена 5'-фосфата на ^{32}P -аналог [17]. Алкилирование мишени регистрировали гель-электрофорезом в денатурирующем ПААГ (рис. 2) по появлению продуктов деструкции полинуклеотидной цепи в местах модифицированных оснований после обработки препаратов мишени 10% водным пиперидином в течение 50 мин при 95°C [18]. За степень модификации ДНК-мишени принимали процентное отношение радиоактивности в пятне, соответствующем продукту расщепления мишени по заданному основанию, к суммарной радиоактивности в дорожке геля. Статистическое расщепление олигонуклеотида-мишени по остаткам пуринов (дорожки А + G, рис. 2) получали обработкой препарата ДНК 2% раствором дифениламина в 66% муравьиной кислоте (25°C, 35 мин) [19].

Работа финансировалась в рамках программы РФФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 1. С. 102 - 104.
2. Kutyavin I.V., Podymingogin M.A., Bazuna Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Mamayev S.V., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1988. V. 238. № 1. P. 35 - 38.
3. Zarytova V.F. // Nucl. Acid. Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 103 - 106.
4. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. № 7. С. 895 - 900.
5. Stein C.A., Pal R., De Vico A.L., Hoke G., Mumbauer S., Kinsteer O., Sarngadharan M.G., Letsinger R.L. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 9. P. 2439 - 2444.
6. Boutorin A.S., Gus'kova L.V., Ivanova E.M., Kobetz N.D., Zarytova V.F., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlasov V.V. // FEBS Lett. 1989. V. 254. № 1/2. P. 126 - 132.
7. Lokhov S.G., Podymingogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414 - 419.
8. Gryaznov S.M., Lloyd D.H. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 25. P. 5909 - 5913.

9. Letsinger R.L., Chaturvedi S.K., Farooqui F., Sallunkhe M. // J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. № 16. P. 7535 - 7536.
10. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516 - 521.
11. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Часовских М.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 610 - 616.
12. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911 - 920.
13. Zarytova V.F., Ivanova E.M., Levina A.S. // Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1/3. P. 295 - 298.
14. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тугеева Н.Г., Чимитова А.Т. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210 - 214.
15. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65 - 72.
16. Барам Г.И., Бунева В.Н., Добрикова Е.Ю., Петров В.Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 613 - 620.
17. Berker K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3176 - 3184.
18. Махат А.М., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499 - 560.
19. Коробко В.Г., Грачев С.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1420 - 1422.

Interaction of Short Oligonucleotide Derivatives with Nucleic Acids.

Part I. Effect of Various Type Effectors on Alkylation of Target DNA

D. V. Pyshnyi, I. A. Pyshnaya, S. G. Lokhov, E. M. Ivanova, and V. F. Zarytova

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

Abstract – It was shown that the tandem of the derivatives of short oligonucleotides efficiently and site specifically interacts with target 20 base deoxyribonucleotide (M). It was demonstrated that the very low hybridization ability of tetranucleotide (D) and its 3'-cholesterol and 3'-estrone esters (D-ChS and D-EsS, respectively) increases significantly in the presence of the effectors: octanucleotides (E_1 and E_2), and their 5',3'-diphenazinium (Phn- E_1 -Phn and Phn- E_2 -Phn) and 5'-cholesteryl-3'-phenazinium (ChS- E_1 -Phn and ChS- E_2 -Phn) derivatives, which flank them on the target strand. The influence of the effectors on the interaction of the target M with tetranucleotide D or its alkylating derivatives (RCl-D) increases in a series $E_1 + E_2 < \text{ChS-}E_1\text{-Phn} + \text{ChS-}E_2\text{-Phn} < \text{Phn-}E_1\text{-Phn} + \text{Phn-}E_2\text{-Phn}$. For the steroid derivatives, D-ChS and D-EsS, and the reagents based on them (RCl-D-ChS and RCl-D-EsS), this series is $E_1 + E_2 < \text{Phn-}E_1\text{-Phn} + \text{Phn-}E_2\text{-Phn} < \text{ChS-}E_1\text{-Phn} + \text{ChS-}E_2\text{-Phn}$. The modification level of the target M with derivatives RCl-D-EsS in the presence of ChS- E_1 -Phn and ChS- E_2 -Phn reaches 40% even at 37°C under conditions close to physiological. The possibility of using 5'-cholesteryl-3'-phenazinium-containing oligonucleotides as effectors of the interaction of target DNA with the derivatives of short oligonucleotides was demonstrated.

Key words: oligonucleotide derivatives, effectors, modification of DNA, thermostability of duplexes.