



УДК 577.113(4+7)+547.92

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ. IV*. МОДИФИКАЦИЯ ДНК АЛКИЛИРУЮЩИМ ПРОИЗВОДНЫМ ТЕТРАНУКЛЕОТИДА В ПРИСУТСТВИИ ЭФФЕКТОРОВ В СОСТАВЕ ПРАВИЛЬНЫХ И НЕПРАВИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 1997 г. Д. В. Пышный, И. А. Пышная, С. Г. Лохов, Е. М. Иванова[#], В. Ф. Зарытова*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8**Поступила в редакцию 06.12.96 г. Принята к печати 24.06.97 г.*

Продемонстрирована возможность дискриминации всех мисматчей в исследованном комплексе одноцепочечной ДНК-мишени и тетра nukлеотида при 25 и 37°C путем алкилирования мишени производным тетра nukлеотида, содержащим на 5'-концевом фосфате остаток 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламина, в присутствии пары фланкирующих эффекторов – ди-N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых производных октануклеотидов. Показано, что величина фактора дискриминации (отношение степени модификации мишени реагентом в правильном комплексе к степени модификации в комплексе с мисматчем) однобуквенного несоответствия в сайте связывания тетра nukлеотида в присутствии эффекторов при 25°C в зависимости от типа мисматча и его положения в комплексе составляет 4–500 и превышает 400 для всех исследованных типов однобуквенных мисматчей при 37°C. Показана селективность модификации ДНК-мишени алкилирующим производным 3'-фосфоэстронового эфира тетра nukлеотида pCAGX (X = C; T; A; G) в присутствии пары гидрофобных эффекторов – 5'-холестерил-3'-феназиниевых производных октануклеотидов; факторы дискриминации 3'-концевых мисматчей T · G, A · G и G · G составляют при 37°C 1,8, 400 и 400 соответственно.

Ключевые слова: модификация ДНК, термостабильность дуплексов, эффекторы, селективность взаимодействия олигонуклеотидов, мисматч.

Олигонуклеотиды и их производные в настоящее время играют важную роль при исследовании многих ключевых процессов, протекающих с участием нуклеиновых кислот, и для конструирования препаратов, направленно воздействующих на заданные участки НК. Однако при физиологических условиях обычно применяемые олигонуклеотиды длиной 16–25 нт обладают сравнительно низкой селективностью взаимодействия с НК, поскольку способны эффективно образовывать как правильные, так и несовершенные комплексы. В последние годы проблема повышения селективности взаимодействия олигонуклеотидов с НК-мишенью привлекает внимание большого числа исследователей [2–7]. В предыдущей работе [8] нами предложен новый подход, позволяющий осуществлять высокоселективную модификацию НК-мишени только в правильных комплементарных комплексах, который основан на использовании

тандемов производных коротких олигонуклеотидов. Было проведено сравнение селективности модификации ДНК-мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов различной длины в правильных комплексах и в комплексах, содержащих одну неканоническую пару оснований A · G (мисматч), и показано, что алкилирующее производное тетра nukлеотида в присутствии пары фланкирующих эффекторов модифицирует мишень только при образовании правильного комплекса, в то время как додекануклеотидный реагент с одинаковой эффективностью модифицирует мишень как в правильном комплексе, так и в комплексе, содержащем один мисматч.

В данной работе проведена оценка способности тетра nukлеотида в составе тандема с парой эффекторов дискриминировать все возможные однобуквенные несоответствия в сайте связывания с мишенью путем сравнения эффективности модификации мишени алкилирующим производным тетра nukлеотида в правильном и неправильных комплексах, содержащих один мисматч.

Исследование проводили, осуществляя модификацию меченого ³²P по 5'-концевому фосфату эйкозануклеотида M тетра nukлеотидными реагентами (RCl)pN₄ в присутствии пары фланкирующих

* Сообщение III см. [1].

Сокращения: префикс "d" в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен; НК – нуклеиновые кислоты, Phn – N-(2-гидроксиэтил)феназиний, RCl – 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламин, Chs-ОН – холестерин, Est-ОН – эстрон.

[#] Автор для переписки.

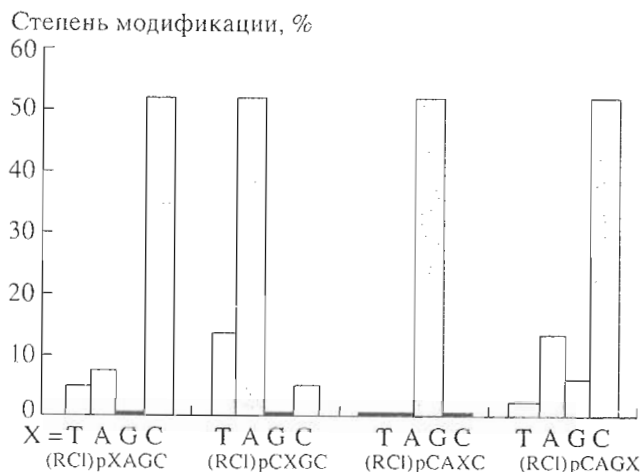


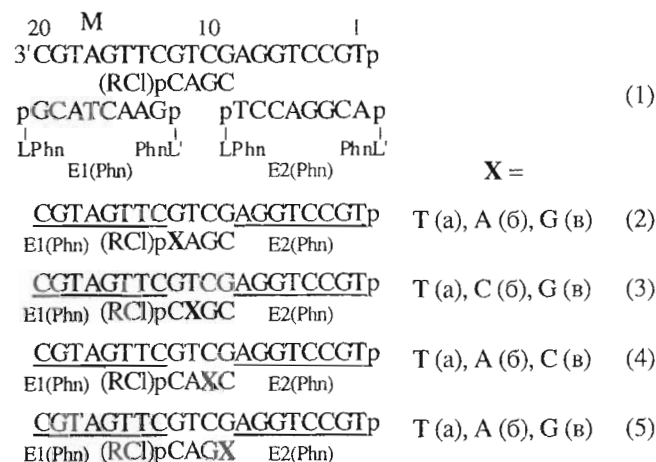
Рис. 1. Степень модификации мишени алкилирующим реагентом (RCI)pN₄ в правильном комплексе (заштрихованный столбик) и несовершенных комплексах (светлые столбики) в присутствии пары эффекторов E1(Phn) и E2(Phn) при 25°C.

эффекторов E1(Phn) и E2(Phn) – дифеназиниевых производных октануклеотидов (схема 1). Степень модификации мишени в различных комплексах определялась после электрофоретического разделения реакционной смеси, выдержанной в течение времени, равного 5 периодам полупревращения [9] реакционноспособной группы, и обработанной пиперидином.

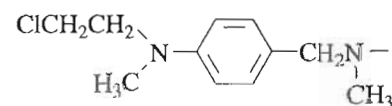
О способности тетрануклеотидного реагента в составе тандема дискриминировать комплексы с мисматчем судили по фактору дискриминации (по аналогии с фактором дискриминации при выявлении точечных мутаций методом лигирования олигонуклеотидов [1]), который рассчитывали как

отношение степени модификации мишени тетрануклеотидным реагентом в правильном комплексе к степени модификации мишени в комплексе, содержащем один мисматч.

Схема 1



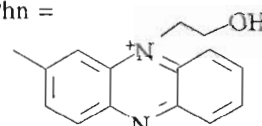
RCI =



PhnL' = -OCH₂CH₂NH-Phn

LPhn = Phn-NH-CH₂CH₂CH₂NH-

Phn =



Комплексы мишени и реагента, содержащие мисматч, формировали, вводя поочередно все

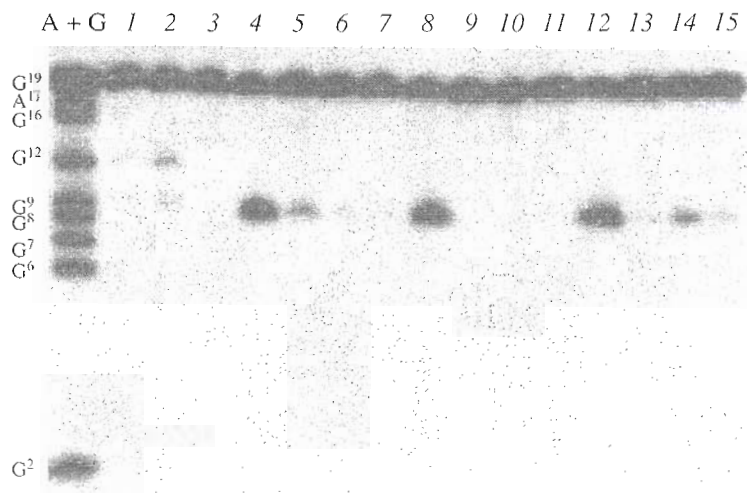


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов модификации ³²P-меченой ДНК-мишени (после пиперидиновой обработки) при 25°C алкилирующими реагентами (RCI)pN₄ в присутствии пары эффекторов E1(Phn) и E2(Phn) в правильном комплексе (1) (дорожки 4, 8, 12) и несовершенных комплексах (2а)–(2в) (дорожки 1–3), (3а)–(3в) (дорожки 5–7), (4а)–(4в) (дорожки 9–11), (5а)–(5в) (дорожки 13–15).

Степень модификации мишени М алкилирующими реагентами на основе тетрануклеотидов в составе правильного и неправильных комплексов и фактор дискриминации комплексов с мисматчем

Комплекс	Реагент	Мисматч	Степень модификации, %*		Фактор дискриминации		$T_{пл}, ^\circ C^{**}$
			25 $^\circ C$	37 $^\circ C$	25 $^\circ C$	37 $^\circ C$	
(1)	(RCl)pCAGC	—	55	42	1	1	38
(2a)	(RCl)pTAGC	T · G	5	0	11	>400	8
(2б)	(RCl)pAAGC	A · G	8	0	7	>400	***
(2в)	(RCl)pGAGC	G · G	0	0	>500	>400	8
(3a)	(RCl)pCTGC	T · T	14	0	4	>400	15
(3б)	(RCl)pCCGC	C · T	5	0	11	>400	<6
(3в)	(RCl)pCGGC	G · T	0	0	>500	>400	22
(4a)	(RCl)pCATC	T · C	0	0	>500	>400	<0
(4б)	(RCl)pCAAC	A · C	0	0	>500	>400	<0
(4в)	(RCl)pCACCC	C · C	0	0	>500	>400	<0
(5a)	(RCl)pCAGT	T · G	2	0	28	>400	12
(5б)	(RCl)pCAGA	A · G	14	0	4	>400	21
(5в)	(RCl)pCAGG	G · G	6	0	9	>400	22

* Для расчета фактора дискриминации в случае отсутствия продуктов модификации степень модификации принимали за 0.1% в соответствии с точностью определения радиоактивности.

** Температуры плавления комплексов, образованных мишенью М и соответствующим тетрануклеотидом в присутствии пары дифеназиновых эффектов.

*** Дифференциальная кривая не имеет выраженного максимального значения.

возможные однобуквенные замены в адресную часть реагента – тетрануклеотид. Таким образом было проведено сравнение эффективности модификации мишени полностью комплементарным тетрануклеотидным реагентом (RCl)pCAGC (комплекс 1) и реагентами (RCl)pXAGC (комплексы 2a–2в), (RCl)pCXGC (комплексы 3a–3в), (RCl)pCAXC (комплексы 4a–4в), (RCl)pCAGX (комплексы 5a–5в) и оценен фактор дискриминации каждого мисматча.

При 25 $^\circ C$ степень модификации мишени реагентом (RCl)pCAGC в правильном комплексе (1) достигает 55%, при наличии мисматчей в комплексах М · (RCl)pN₄ наблюдается резкое падение степени модификации (рис. 1, 2, таблица).

При введении нуклеотидной замены в первое положение реагента (RCl)pXAGC (комплексы 2) в случае G · G-мисматча модификация мишени вообще не регистрируется (комплекс 2в). С учетом точности определения радиоактивной метки можно предположить, что степень модификации мишени в этом случае не может быть более 0.1%, и, таким образом, фактор дискриминации G · G-мисматча реагентом (RCl)pGAGC превышает 500. В случае образования комплексов с мисматчами T · G и A · G, т.е. при использовании реагентов (RCl)pTAGC и (RCl)pAAGC (комплексы 2a и 2б), степень модификации мишени падает на порядок

по сравнению с правильным комплексом (1), и фактор дискриминации этих мисматчей составляет 11 и 7 соответственно. Кроме того, наличие мисматча в первом положении комплекса мишени и реагента приводит к изменению направленности алкилирования – модификация подвергается в большей степени G¹²-основание мишени, в то время как в правильном комплексе основным сайтом модификации является G⁹-основание (рис. 2).

В комплексах (3) при замене второго звена в нуклеотидной последовательности реагента эффективность модификации мишени падает в ряду (RCl)pCTGC > (RCl)pCCGC > (RCl)CGGC, причем в последнем случае модификация не регистрируется. Величины факторов дискриминации мисматчей в этом положении составляют 4 (T · T), 11 (C · T) и >500 (G · T).

Модификация мишени реагентами (RCl)pCATC, (RCl)pCAAC и (RCl)pCACCC в комплексах (4) полностью отсутствует (рис. 2), т.е. тандем эффектор + реагент + эффектор с высокой точностью дискриминирует в комплексе М · (RCl)pCAXC мисматч, соответствующий третьему нуклеотидному звену тетрануклеотида (фактор дискриминации для мисматчей T · C, A · C и C · C в этом положении превышает 500).

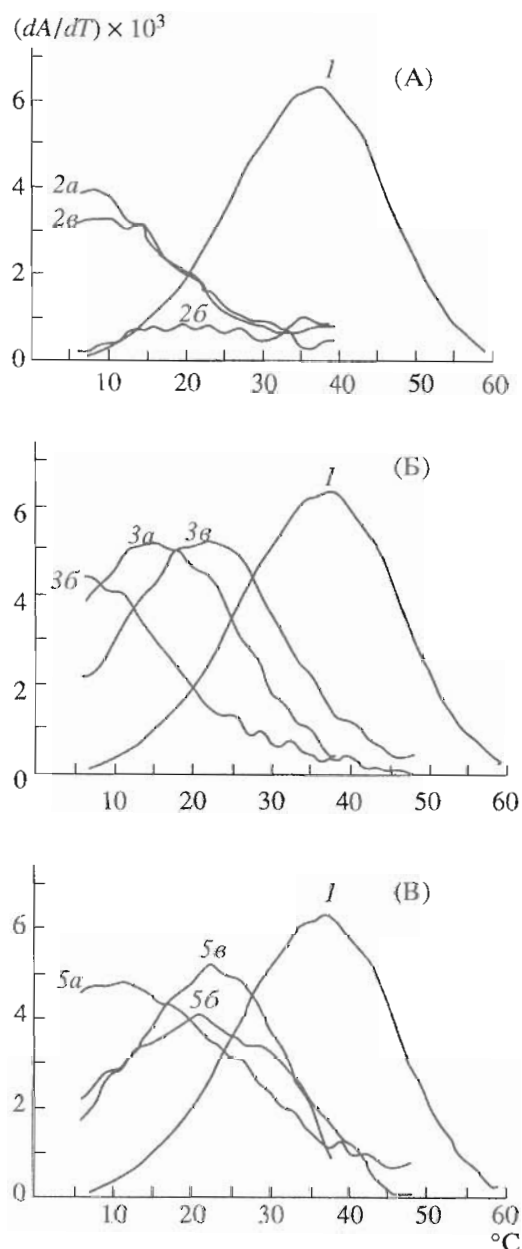


Рис. 3. Дифференциальные кривые плавления комплексов $M \cdot pN_4$ в присутствии пары фланкирующих эффекторов E1(Phn) и E2(Phn): (А) – $pN_4 = pAAGC$ (2б), $pGAGC$ (2в), $pTAGC$ (2а), $pCAGC$ (1); (Б) – $pN_4 = pCCGC$ (3б), $pCTGC$ (3а), $pCGGC$ (3в), $pCAGC$ (1); (В) – $pN_4 = pCAGT$ (5а), $pCAGA$ (5б), $pCAGG$ (5в), $pCAGC$ (1).

В комплексах (5) при нуклеотидной замене в четвертом положении реагента $(RCl)pCAGX$ наименее селективным оказывается взаимодействие мишени с реагентом $(RCl)pCAGA$ (фактор дискриминации мисматча $A \cdot G$ равен 4). Наиболее дискриминируемым мисматчем в четвертом положении комплекса мишень · реагент является пара $T \cdot G$ (фактор дискриминации равен 28).

Таким образом, из рассмотрения всех 12 неправильных комплексов $M \cdot (RCl)pN_4$, содержащих однонуклеотидное несоответствие, можно заключить, что мисматчи, соответствующие третьему основанию в последовательности реагента, вызывают максимальное падение степени алкилирования мишени. Мисматчи, соответствующие четвертому положению, дискриминируются в меньшей степени. Кроме того, дискриминация одного и того же нуклеотидного несоответствия в комплексе мишень · реагент существенно зависит от его местонахождения, как это наблюдается, например, для $G \cdot G$ -мисматча в первом и четвертом положениях комплекса. Можно отметить также, что $A \cdot G$ -мисматч наименее распознаваем как в первом, так и в четвертом положении.

Очевидно, что наличие мисматча в комплексе мишень · реагент должно приводить к его дестабилизации по сравнению с правильным комплексом. Чтобы выяснить, связано ли различие в эффективности алкилирования мишени тетра-нуклеотидными реагентами в составе тандемов с падением термической стабильности неправильных комплексов, были определены температуры плавления комплексов $M \cdot pN_4$ в присутствии дифеназиниевых эффекторов E1(Phn) и E2(Phn).

Как видно из рис. 3 и таблицы, правильный комплекс $M \cdot pCAGC$ в присутствии дифеназиниевых эффекторов имеет $T_{пл} 38^\circ C$ [11], а введение однонуклеотидной замены в последовательность тетра-нуклеотида вызывает существенную дестабилизацию дуплекса $M \cdot pN_4$.

Наиболее фатально на стабильности комплекса мишень · тетра-нуклеотид сказываются мисматчи в третьем положении – образование комплексов $M \cdot pCAXC$ в присутствии эффекторов при температурах выше $0^\circ C$ не регистрируется, что согласуется с отсутствием продуктов модификации мишени в комплексах $M \cdot (RCl)pCAXC$ (фактор дискриминации превышает 500).

Несколько хуже дискриминируются как при алкилировании, так и при комплексообразовании нуклеотидные замены в первом положении тетра-нуклеотида. Температуры плавления комплексов с мисматчами $T \cdot G$ и $G \cdot G$ составляют всего $8^\circ C$, достоверно определить значение температуры плавления комплекса $M \cdot pAAGC$ ($A \cdot G$ -мисматч) не удалось (рис. 3А). Фактор дискриминации при алкилировании мишени в составе комплексов (2) увеличивается в ряду мисматчей $A \cdot G < T \cdot G \ll G \cdot G$.

Температура плавления неправильных комплексов $M \cdot pCXGC$ (мисматч во втором положении комплекса) уменьшается в ряду $G \cdot T > T \cdot T > C \cdot T$ от 22 до $6^\circ C$ (фактор дискриминации возрастает в ряду $T \cdot T < C \cdot T \ll G \cdot T$).

Введение нуклеотидной замены в четвертое положение тетра-нуклеотида оказывает наименьшее дестабилизирующее влияние на комплексы

$M \cdot pN_4$, что согласуется с более слабой дискриминацией мисматча в четвертом положении комплекса при алкилировании. Температура плавления комплексов (5в) и (5б) с $G \cdot G$ и $A \cdot G$ -мисматчами падает на 16 и 17°C соответственно по сравнению с температурой плавления правильного комплекса (1). Наименее стабильным оказывается дуплекс $M \cdot pCAGT$ (мисматч $T \cdot G$), который имеет $T_{пл}$ 12°C. Фактор дискриминации при алкилировании в составе комплексов (5) падает в ряду: $T \cdot G > G \cdot G > A \cdot G$.

Как видно из представленных данных, наблюдается качественное соответствие между стабильностью неправильных комплексов и эффективностью модификации мишени в зависимости от положения мисматча. Внутри групп комплексов с одинаковым расположением мисматча из этой корреляции выпадают комплексы (2в), (3в) и (5в), т.е. комплексы, образованные тетра nukлеотидами с заменой одного звена на гуанозин. Такое несоответствие, вероятно, может быть отчасти вызвано тем, что наряду с алкилированием мишени может происходить и самоалкилирование реагента в комплексе, эффективность которого увеличивается при замене в последовательности тетра nukлеотида оснований C^1 , C^4 или A^2 на более нуклеофильное основание G .

При увеличении температуры с 25 до 37°C доля мишени, связанной в неправильном комплексе с тетра nukлеотидами, содержащими однонуклеотидную замену, уменьшается существенно, в то время как степень ассоциации мишени с полностью комплементарным тетра nukлеотидом $pCAGC$ снижается только до 0.5 (рис. 3). Это позволяет предположить, что повышение температуры реакции до 37°C должно значительно увеличить селективность модификации мишени.

Как видно из приведенных в таблице данных, при 37°C степень алкилирования мишени в правильном комплексе (1) снижается незначительно и составляет 42%. Реагенты $(RCI)pN_4$, содержащие однонуклеотидную замену, не модифицируют мишень при этой температуре, зарегистрировать продукты модификации не удалось даже в комплексах (2б), (3а) и (5б) (рис. 4), в которых алкилирование при 25°C протекает в большей степени, чем в случае остальных неправильных комплексов (таблица). Фактор дискриминации всех возможных мисматчей в комплексах (2)–(5) при 37°C превышает 400.

Таким образом, использование тандемов типа $E1(Phn) + (RCI)pN_4 + E2(Phn)$ обеспечивает при физиологических температурах (37°C) высокоселективную модификацию мишени, т.е. модификацию только в случае образования правильного комплекса, и тем самым позволяет высокоэффективно дискриминировать все возможные од-

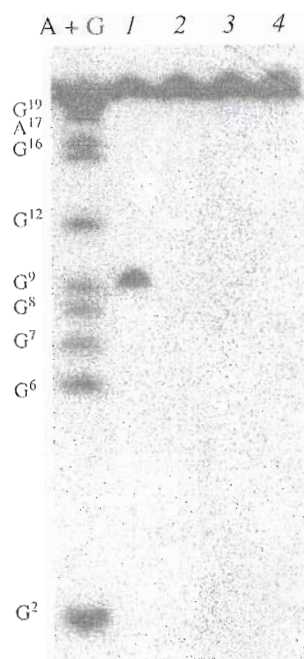
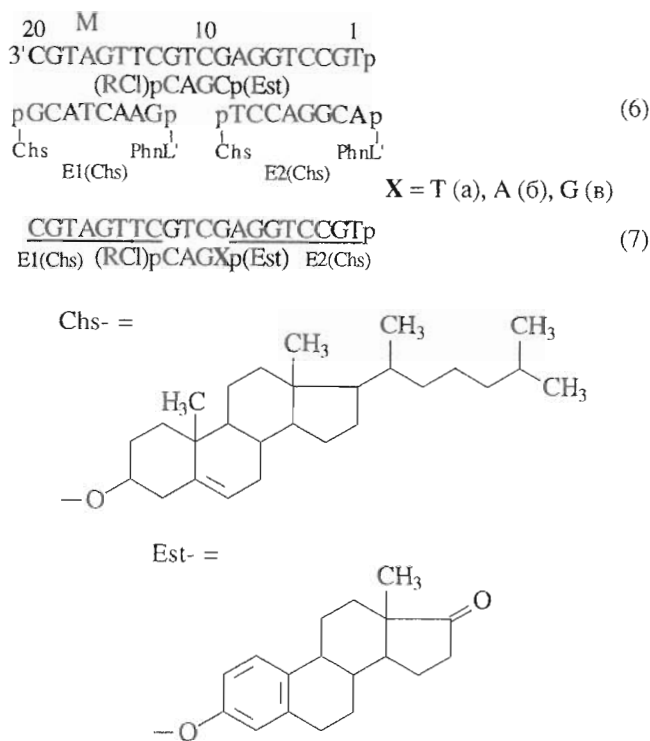


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов модификации ^{32}P -меченой ДНК-мишени (после пиперидиновой обработки) при 37°C алкилирующим реагентом $(RCI)pN_4$ в присутствии пары эффекторов $E1(Phn)$ и $E2(Phn)$ в правильном комплексе (1) и несовершенных комплексах (2б), (3а) и (5б) (дорожки 1–4 соответственно).

нонуклеотидные несоответствия в сайте связывания реагента.

Ранее нами было показано, что тандемы коротких производных олигонуклеотидов, содержащих остатки холестерина (Chs) и эстрогена (Est), также могут быть использованы для модификации ДНК-мишени [11]. Эффективность модификации мишени такими тандемами обусловлена дополнительной стабилизацией комплекса мишени и реагента $(RCI)pN_4p(Est)$ вследствие гидрофобного контакта сближенных в пространстве стероидных группировок реагента и эффектора $E2(Chs)$ (схема 2). Однако такие взаимодействия могут повышать стабильность не только правильных, но и неправильных комплексов мишень · реагент. Поэтому на следующем этапе работы было проведено сравнение эффективности модификации мишени тандемом пары гидрофобных эффекторов 5'-холестерил-3'-феназиниевых производных октануклеотидов $E1(Chs)$ и $E2(Chs)$ и реагента $(RCI)pCAGXp(Est)$, варьируемый 3'-концевой нуклеотид которого содержит фосфоэстроновую группировку. Сравнение проводили при 37°C, поскольку гидрофобные тандемы представляют интерес для модификации внутриклеточных нуклеиновых кислот.



Согласно данным рис. 5, модификация мишени в правильном комплексе (6) при 37°C протекает

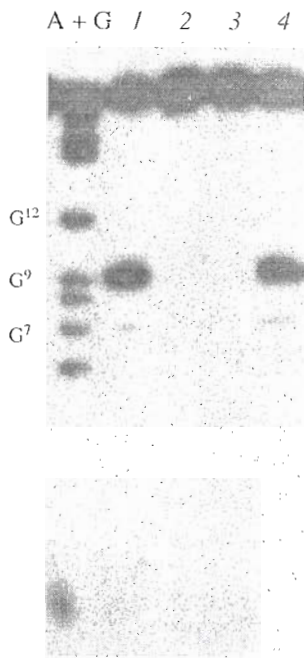


Рис. 5. Электрофоретический анализ продуктов модификации ^{32}P -меченой ДНК-мишени (после пиперидиновой обработки) при 37°C алкилирующим реагентом (RCl)pN₄p(Est) в присутствии пары эффекторов E1(Chs) и E2(Chs) в комплексах (6), (7в), (7б), (7а) (дорожки 1–4 соответственно).

на 40%. В случае реагентов (RCl)pCAGAp(Est) и (RCl)pCAGGp(Est) (мисматчи А · G и G · G соответственно) в комплексах (7б) и (7в) модификация мишени не регистрируется, так же как и в комплексах (5б) и (5в). Однако при использовании реагента (RCl)pCAGTp(Est) в комплексе (7а) степень модификации падает только до 22%. Таким образом, наличие соседствующих гидрофобных остатков на 3'-конце реагента и 5'-конце эффектора не влияет на дискриминацию пурин-пуриновых А · G- и G · G-мисматчей. В то же время наиболее дискриминируемый в группе комплексов (5) Т · G-мисматч в комплексе М · E1(Chs) + (RCl)pCAGTp(Chs) + E2(Chs) имеет самый низкий фактор дискриминации (1.8). Такое несоответствие может быть отчасти обусловлено тем, что Т · G-мисматч, вызывая наименьшее искажение двойной спирали дуплекса [12], приводит тем самым и к минимальному нарушению гидрофобного контакта между остатками стероидов реагента и эффектора, стабилизирующего комплекс мишени и реагента. Однако даже в этом наименее благоприятном случае селективность модификации мишени тетрауклеотидным реагентом в присутствии эффекторов превышает селективность модификации реагентом более протяженной додекануклеотида, который с одинаковой эффективностью алкилирует мишень как в правильном, так и в неправильном комплексе, содержащем один мисматч [8].

Полученные данные свидетельствуют о том, что предлагаемый подход к повышению селективности взаимодействия олигонуклеотидов с ДНК-мишенью, основанный на использовании тандемов производных коротких олигонуклеотидов, обеспечивает проведение модификации мишени только при образовании правильных комплексов мишени и позволяет дискриминировать все возможные нуклеотидные замены в сайте связывания реагента на основе тетрауклеотида. Короткие олигонуклеотиды, более доступные и дешевые по сравнению с протяженными олигонуклеотидами, с использованием предлагаемого подхода могут широко использоваться как в качестве инструмента исследования для решения целого ряда молекулярно-биологических задач, связанных с взаимодействием нуклеиновых кислот, так и в качестве биологически активных соединений и перспективных терапевтических средств ген-направленного действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хлорид N-(2-гидроксиэтил)феназиния любезно предоставлен В.Н. Сильниковым (НИБХ СО РАН). 4-(N-Метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламин (RCl) синтезирован Т.М. Ивановой (НИБХ СО РАН).

Олигонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе исходя из защищенных β -цианэтиловых, *n*-хлорфениловых эфиров 5'-нуклеотидов по [13].

Олигонуклеотиды и их производные выделяли ионообменной (Полисил-СА, "Теоретическая практика", Россия) и обращенно-фазовой (Li-Chrogrer RP 18, Мерск, Германия) хроматографиями на хроматографе Beckman-332.

Конъюгаты $pN_4p(Est)$ получали в условиях фосфотриэфирного синтеза в растворе [14]. Анализ производных $pN_4p(Est)$ проводили методом обращенно-фазовой хроматографии (линейный градиент 0–40% ацетонитрила в 0.05 М $LiClO_4$ за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), определяя времена удерживания на колонке более гидрофобных продуктов реакции относительно контрольного тетрауклеотида ($\Delta t_{уд}$). $pN_4p(Est)$: $\Delta t_{уд} = 9–11$ мин.

$(PhnL)pGCATCAAGp(L'Phn)$, $(PhnL)pTCCA-GGCAp(L'Phn)$ синтезировали по методике [15]. Полученные производные олигонуклеотидов анализировали методом обращенно-фазовой хроматографии (линейный градиент 0–20% ацетонитрила в 0.05 М $LiClO_4$ за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), определяя времена удерживания на колонке более гидрофобных продуктов реакции относительно контрольного октануклеотида ($\Delta t_{уд}$), а также спектрофотометрически по соотношению поглощения растворов целевых продуктов в воде на длинах волн 260 и 530 нм (ϵ_{530} феназиниевого остатка с аминотерминалом составляет $14 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ [15]).

$(PhnL)pGCATCAAGp(L'Phn)$: $\Delta t_{уд} = 11$ мин, $A_{260}/A_{530} = 3.6$; $(PhnL)pGCATCAAGp(L'Phn)$: $\Delta t_{уд} = 10$ мин, $A_{260}/A_{530} = 3.5$.

$(Chs)pGCATCAAGp(L'Phn)$, $(Chs)pTCCAGG-CAp(L'Phn)$. Остаток холестерина на 5'-фосфат и аминотерминал ($CF_3CONH(CH_2)_2O-$) на 3'-фосфат вводили в олигонуклеотидный блок в условиях фосфотриэфирного синтеза по методике [14]. Феназиниевую группировку присоединяли к аминотерминалу как описано ранее [15]. Полученные производные олигонуклеотидов анализировали методом обращенно-фазовой хроматографии (линейный градиент 0–80% ацетонитрила в 0.05 М $LiClO_4$ за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), определяя $\Delta t_{уд}$, а также спектрофотометрически, как описано выше. $(Chs)pGCATCAAGp(L'Phn)$: $\Delta t_{уд} = 24$ мин, $A_{260}/A_{530} = 6.6$; $(Chs)pTCCAGGCAp(L'Phn)$: $\Delta t_{уд} = 23$ мин, $A_{260}/A_{530} = 6.2$.

$(RCI)pN_4$ и $(RCI)pN_4p(Est)$ получали по методу [14] и выделяли обращенно-фазовой хроматографией (линейный градиент ацетонитрила в 0.05 М $LiClO_4$ за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), определяя $\Delta t_{уд}$ относительно исходного тетрауклеотида или его эстронового эфира. $(RCI)pN_4$: $\Delta t_{уд} =$

$= 12–14$ мин (градиент ацетонитрила 0–20%); $(RCI)pN_4p(Est)$: $\Delta t_{уд} = 8–10$ мин (градиент ацетонитрила 0–40%). Содержание активного хлора в олигонуклеотидных реагентах определяли по реакции алкилирования тиосульфата [16], выход которой во всех случаях превышал 90% по данным обращенно-фазовой хроматографии.

Концентрацию олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины ϵ_{260} моно- и динуклеотидов [17], алкилирующей группировки ($1.47 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ [9]), N-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка ($1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ [15]). Влияние стероидных остатков на ϵ_{260} олигонуклеотидных производных не учитывалось.

Исследование термической денатурации олигонуклеотидных дуплексов проводили в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М какодилат натрия (pH 7.4), 1 mM EDTA при концентрации олигонуклеотидных компонентов 1.3×10^{-5} М с использованием установки с терморегулируемой оптической кюветой, разработанной на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милихром" (Россия) на длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин. Температуру плавления определяли с точностью $\pm 0.5^\circ C$. За температуру плавления дуплекса $M \cdot pN_4$ в присутствии $E1(Phn)$ и $E2(Phn)$ принимали температуру, при которой кривая, полученная как разность дифференциальной кривой плавления комплекса $M \cdot pN_4 + E1(Phn) + E2(Phn)$ и дифференциальной кривой плавления комплекса мишени с эфффекторами $M \cdot E1(Phn) + E2(Phn)$, достигала максимального значения [11].

Модификацию ДНК-мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов проводили 8 ч при 37°C и 25 ч при 25°C (более пяти периодов полунионизации связи C–Cl [9]) в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA при концентрациях $[M] = 5 \times 10^{-7}$ М, $[реагент] = [эффектор] = 1 \times 10^{-5}$ М.

5'-³²P-Меченый олигонуклеотид M получали путем обмена 5'-фосфатной группы на радиоактивный аналог [18].

Алкилирование мишени регистрировали геле-электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ по появлению продуктов деструкции полинуклеотидной цепи в местах модифицированных оснований после обработки препаратов мишени 10% водным пиперидином в течение 50 мин при 95°C [19].

За степень модификации ДНК-мишени принимали процентное отношение радиоактивности в пятне, соответствующем продукту расщепления мишени по модифицированному основанию, к суммарной радиоактивности в дорожке геля. Статистическое расщепление олигонуклеотида-мишени по остаткам пуринов (дорожки A + G, рис. 2)

получали обработкой 2% раствором дифениламина в 66% муравьиной кислоте (25°C, 35 мин) [20].

Фактор дискриминации мисматчей в комплексах $M \cdot (RCI)pN_4$ определяли как отношение степени модификации мишени в правильном комплексе (55% при 25°C и 42% при 37°C) к степени модификации в неправильном комплексе при соответствующих температурах.

Работа финансировалась грантом Государственной программы "Новейшие методы биоинженерии" и грантом РФФИ (№ 96-04-50-191).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Табатадзе Д.Р., Третьякова Л.В., Левина А.С., Пышный Д.В., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия, 1997. Т. 23. № 8.
2. Aboul-ela F., Koh D., Tinoco I., Jr., Martin F.H. // Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. P. 4811–4824.
3. Rougee M., Faucon B., Mergny J.L., Barcelo F., Giovannangeli C., Montenay-Garestier T., Helene C. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9269–9278.
4. Best G.C., Dervan P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 1187–1193.
5. Beaucage S.L., Iyer R.P. // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 6123–6194.
6. Prakash G., Kool E.T. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 3523–3528.
7. Wang S., Friedman A.E., Kool E.T. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 9774–9784.
8. Пышный Д.В., Подыминогин М.А., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 561–568.
9. Барам Г.И., Бунева В.Н., Добрикова Е.Ю., Петров В.Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 613–620.
10. Broude N.E., Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 3072–3076.
11. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.
12. Hare D., Shapiro L., Patel D.J. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 7445–7456.
13. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
14. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Часовских М.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 610–616.
15. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutuyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
16. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тугеева Н.Г., Чимитова А.Т. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
17. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
18. Berkner K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3184.
19. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
20. Коробко В.Г., Грачев С.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1420–1422.

Interaction of Short Oligonucleotide Derivatives with Nucleic Acids. IV. Modification of DNA by an Alkylating Tetranucleotide Reagent in the Presence of Effectors in Perfect and Imperfect Complexes

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

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

Abstract—It was demonstrated that any mismatches in a complex formed by an ssDNA target and a tetranucleotide at 25 or 37°C can be discriminated by alkylating the DNA with a tetranucleotide carrying a 4-[*N*-methyl-*N*-(2-chloroethyl)]aminobenzylethylamine residue at the 5'-terminal phosphate in the presence of a pair of flanking effectors, octanucleotide di-*N*-(2-hydroxyethyl)-phenazinium derivatives. The discrimination factor (ratio of the extent of the target modification in the perfect and mismatch-containing complexes) for a single mismatch in the tetranucleotide binding site at 25°C varied between 4 and 500 depending on the type of mismatch and its location in the complex and exceeded 400 at 37°C for all the investigated mismatches. The DNA target modification by the alkylating derivative of the 3'-estrone ester of tetranucleotide pCAGX (X = C, T, A or G) was selective in the presence of a pair of hydrophobic effectors, octanucleotide 5'-cholesteryl-3'-phenazinium derivatives. The discrimination factors for 3'-terminal mismatches T · G, A · G, and G · G were 1, 8, 400, and 400, respectively.

Key words: DNA modification, duplex stability, effectors, oligonucleotide interaction selectivity, mismatch