



УДК 577.113.(4+7)

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ
КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ
VIII*. ОСОБЕННОСТИ МОДИФИКАЦИИ ДНК-МИШЕНИ
В ТАНДЕМНЫХ КОМПЛЕКСАХ
АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

© 1998 г. Д. В. Пышный, С. Г. Лохов, Е. М. Иванова[#], В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8
Поступила в редакцию 24.04.97 г. Принята к печати 11.08.97 г.

Исследовано влияние эффекторов (октануклеотидов и их 3', 5'-ди-N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых производных) на модификацию ДНК-мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов, образующих с мишенью дуплексы различной стабильности. Показано, что эффектор в тандемных комплексах, находясь в непосредственной близости от реакционной группировки олигонуклеотидного реагента, обладающего высокой гибридизационной способностью, с одной стороны, увеличивает стабильность дуплекса реагент · мишень, с другой – изменяет направленность алкилирования и снижает эффективность модификации мишени при температурах, обеспечивающих высокую степень ассоциации мишени с реагентом. Напротив, в случае олигонуклеотидных реагентов, образующих слабые комплексы с мишенью, эффекторы способствуют как повышению стабильности дуплекса мишень · реагент, так и увеличению степени алкилирования мишени реагентом во всем исследованном температурном диапазоне. Полученные данные свидетельствуют о том, что различное влияние эффекторов на модификацию мишени реагентами с различными гибридизационными свойствами связано с конформационными особенностями дуплексных участков мишень · реагент. Увеличение жесткости структуры дуплекса мишень · реагент может приводить к снижению эффективности модификации мишени в тандемных комплексах.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, реакционноспособные производные, модификация ДНК, тандемные комплексы, термодинамическая стабильность, эффекторы.

В последнее время для увеличения термической стабильности комплексов олигонуклеотидов с НК-мишенью стали использовать вспомогательные олигонуклеотиды или эффекторы, которые повышают степень ассоциации соседнего олигонуклеотида в тандемном комплексе с НК-мишенью благодаря кооперативному взаимодействию компонентов тандема [2, 3]. Такие вспомогательные олигонуклеотиды находят применение для создания искусственных рибозимов [4], фотомодификации НК-мишеней олигонуклеотидными производными, содержащими остаток псоралена [5], при секвенировании с использованием

тандемных праймеров [6–8], при конструировании “бинарных” реагентов – производных олигонуклеотидов, которые способны вызывать модификацию ДНК-мишени только при непосредственном сближении друг с другом в тандемных комплексах [9]. Как было показано нами ранее, использование вспомогательных олигонуклеотидов-эффекторов, комплексообразующие свойства которых усилены введением двух N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых группировок [10], позволяет осуществлять эффективную и сайт-специфичную модификацию ДНК-мишеней производными очень коротких олигонуклеотидов – тетрамеров, несущих различные реакционноспособные группировки (остаток 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламина [11, 12], блеомицина [13], перфторарилазида [14]).

В предыдущей работе [1] на примере модификации ДНК-мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов было показано, что повышение стабильности комплекса мишень · реагент может

* Сообщение VII см. [1].

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты, Phn – остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, RCl – 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламино-; префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки.

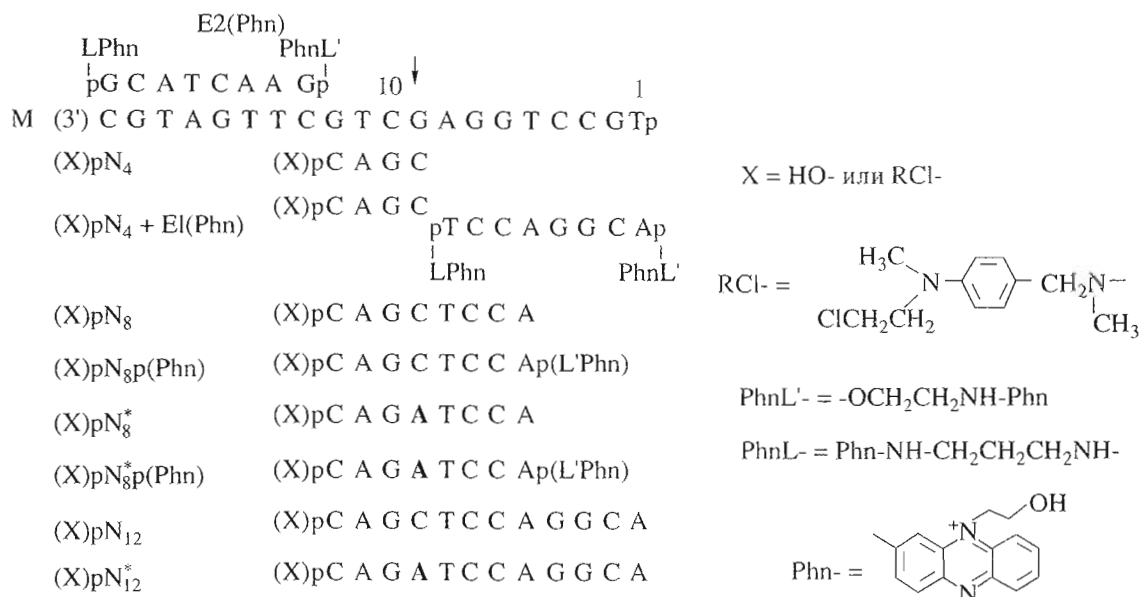


Схема 1.

приводить не только к повышению, но и к понижению эффективности модификации мишени и изменению позиционной направленности алкилирования при повышении температуры реакции вследствие конформационных изменений в его структуре. Поскольку вспомогательный олигонуклеотид-эффектор в тандемном комплексе стабилизирует дуплекс мишень · реагент и тем самым повышает жесткость его структуры, можно предположить, что в зависимости от гибридизационных свойств олигонуклеотидного реагента

эффектор может приводить не только к повышению, но и к уменьшению эффективности модификации мишени в тандемных комплексах.

В данной работе исследовано влияние эффекторов на модификацию ДНК-мишени в зависимости от комплексообразующих свойств компонентов тандема – эффектора и алкилирующего производного олигонуклеотида, несущего на 5'-концевом фосфате остаток 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламина (RCl) и температуры. Показано, что эффективность модификации мишени в тандемных комплексах зависит от конформационных особенностей структуры тандемного комплекса и не всегда коррелирует со стабильностью дуплекса мишень · реагент.

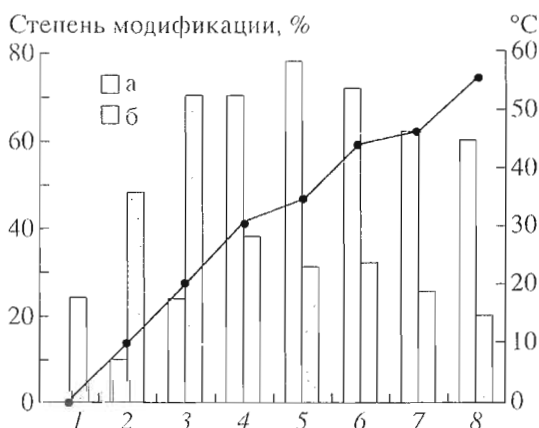


Рис. 1. Степень модификации мишени М при 20°C реагентами (RCl)pN₄ (1), (RCl)pN₈* (2), (RCl)pN₄ + E2(Phn) (3), (RCl)pN₈* p(Phn) (4), (RCl)pN₈ (5), (RCl)pN₈p(Phn) (6), (RCl)pN₁₂* (7), (RCl)pN₁₂ (8) в отсутствие (а) и в присутствии эффектора E2(Phn) (б), а также температуры плавления соответствующих комплексов олигонуклеотид · мишень

Влияние гибридизационных свойств олигонуклеотидного производного, несущего алкилирующую группировку, на эффективность модификации мишени в тандемных комплексах

Зависимость эффективности модификации ДНК-мишени в тандемных комплексах от гибридизационных свойств олигонуклеотидных реагентов изучали, сравнивая при одинаковой температуре эффективность модификации 20-звенного олигонуклеотида М алкилирующими производными олигонуклеотидов (RCl)pN₄, (RCl)pN₄ + E1(Phn), (RCl)pN₈, (RCl)pN₈*, (RCl)pN₈p(Phn), (RCl)pN₈* p(Phn), (RCl)pN₁₂ и (RCl)pN₁₂*, использованными в предыдущей работе [1] (схема 1). Все олигонуклеотидные реагенты имеют одинаковую 5'-концевую последовательность (pCAG) и

Структура мишени М, реагентов и эффекторов	Обозначения комплексов, образуемых системами олигонуклеотидов с мишенью М
(3')CGTAGTTCTCGAGGTCCGTr (M) (X)pCAGC	M · (X)pN ₄
(X)pCAGC (PhnL)pGCATCAAGp(L'Phn)	M · (X)pN ₄ + E2(Phn)
(X)pCAGC (PhnL)pTCCAGGC Ap(L'Phn)	M · (X)pN ₄ + E1(Phn)
(X)pCAGC (PhnL)pTCCAGGC Ap(L'Phn) (PhnL)pGCATCAAGp(L'Phn)	M · (X)pN ₄ + E1(Phn) + E2(Phn)
(X)pCAGCTCCA	M · (X)pN ₈
(X)pCAGCTCCA pGCATCAAG	M · (X)pN ₈ + E2
(X)pCAGCTCCA (PhnL)pGCATCAAGp(L'Phn)	M · (X)pN ₈ + E2(Phn)
(X)pCAGCTCCAGGCA	M · (X)pN ₁₂
(X)pCAGCTCCAGGCA pGCATCAAG	M · (X)pN ₁₂ + E2
(X)pCAGCTCCAGGCA (PhnL)pGCATCAAGp(L'Phn)	M · (X)pN ₁₂ + E2(Phn)

X = HO- или RCl-

Схема 2.

обеспечивают широкий диапазон термостабильности, а следовательно, и жесткости конформаций комплекса реагент · мишень при одной и той же температуре. В качестве эффектора использовали 3',5'-ди-N-(2-гидроксиэтил)феназиниевое производное октануклеотида E2(Phn) (схема 1), который формирует один и тот же кооперативный контакт со всеми выбранными реагентами. Температура плавления комплекса M · E2(Phn) составляет 55°C [12].

В зависимости от температуры реакции и комплексообразующей способности олигонуклеотидной части реагента в присутствии эффектора возможно образование как тандемных комплексов мишень · реагент + эффектор, так и комплексов мишени с отдельными компонентами тандема мишень · реагент или мишень · эффектор. Для обеспечения модификации мишени выбранными реагентами исключительно в составе тандемного комплекса мишень · реагент + эффектор реакции проводили при 20°C, поскольку степень ассоциации мишени с эффектором E2(Phn) при этой температуре должна быть близка к 1.

Как было показано ранее [1], в отсутствие эффектора степень модификации мишени при 20°C коррелирует с гибридационными свойствами реагента, если степень ассоциации мишени с соответствующим реагентом меньше 1. В случае, когда степени ассоциации комплексов становятся близкими к 1, т.е. при увеличении комплексообразующей способности реагентов, эффективность модификации мишени реагентами уменьшается. Аналогичная зависимость наблюдается и при образовании тандемного комплекса мишень · реагент + эффектор (рис. 1). В присутствии E2(Phn) увеличение выхода модификации мишени олигонуклеотидными реагентами происходит только при использовании реагентов со слабой способностью к комплексообразованию (RCl)pN₄, (RCl)pN₈* и (RCl)pN₄+E1(Phn). Реагенты на основе олигонуклеотидов с большей гибридационной способностью модифицируют мишень в тандемных комплексах в меньшей степени, чем в отсутствие эффектора (рис. 1). В случае алкилирующего производного полностью комплементарного октануклеотида (RCl)pN₈ добавление

Температуры плавления комплексов $M \cdot pN_n$ в отсутствие и в присутствии эффекторов (Условия см. "Экспер. часть")

Дуплекс	Эффектор	$T_{пл}, ^\circ C$
$M \cdot pN_4$	–	<5
	E2(Phn)	24
$M \cdot pN_4$	E1(Phn)	20
	E1(Phn) + E2(Phn)	38
$M \cdot pN_8$	–	35
	E2	38
$M \cdot pN_{12}$	E2(Phn)	45
	–	55
	E2	55
	E2(Phn)	62

эффектора снижает выход модификации с 78 до 31%. Снижение выхода наблюдается также в случае в случае реагентов на основе додекануклеотидов $(RCl)pN_{12}^*$ и $(RCl)pN_{12}$, а также в случае реагента на основе октануклеотидов, содержащих остаток феназиния на 3'-конце $(RCl)pN_8^* p(Phn)$ и $(RCl)pN_8 p(Phn)$.

Таким образом, эффектор может не только способствовать алкилированию мишени реагентами, но и снижать выход модификации, что проявляется в случаях, когда степень ассоциации мишени с реагентом близка к 1.

Влияние эффектора на характер модификации мишени в условиях неполного связывания мишени с реагентом с высокой комплексообразующей способностью исследовали путем сравне-

ния эффективности модификации в интервале температур от 20 до 70 $^\circ C$.

Температурная зависимость модификации мишени в тандемных комплексах олигонуклеотидными реагентами с различными гибридизационными свойствами

Температурную зависимость эффективности и направленности модификации мишени в тандемных комплексах реагентами $(RCl)pN_4$, $(RCl)pN_4 + E1(Phn)$, $(RCl)pN_8$ и $(RCl)pN_{12}$, образующими с мишенью дуплексы различной стабильности, исследовали в присутствии двух типов эффекторов, обладающих различными гибридизационными свойствами. В качестве эффектора наряду с дифеназиниевым производным октануклеотида E2(Phn) использовали нативный октануклеотид E2, образующий с мишенью комплекс с меньшей термической стабильностью ($T_{пл} 35^\circ C$) (схема 2).

Поскольку в присутствии эффектора в зависимости от стабильности комплексов мишень · реагент и мишень · эффектор модификация мишени может проходить как в составе тандемного комплекса мишень · реагент + эффектор, так и в независимом комплексе мишень · реагент, предварительно было определено влияние эффекторов на термическую стабильность комплекса мишени и олигонуклеотидной части реагента (таблица, рис. 2).

Максимальное стабилизирующее влияние эффектора наблюдается в случае комплексов тетра-нуклеотида pN_4 , обладающего самой низкой комплексообразующей способностью (таблица). В присутствии эффектора E2(Phn), гибридизационные свойства которого многократно выше, чем

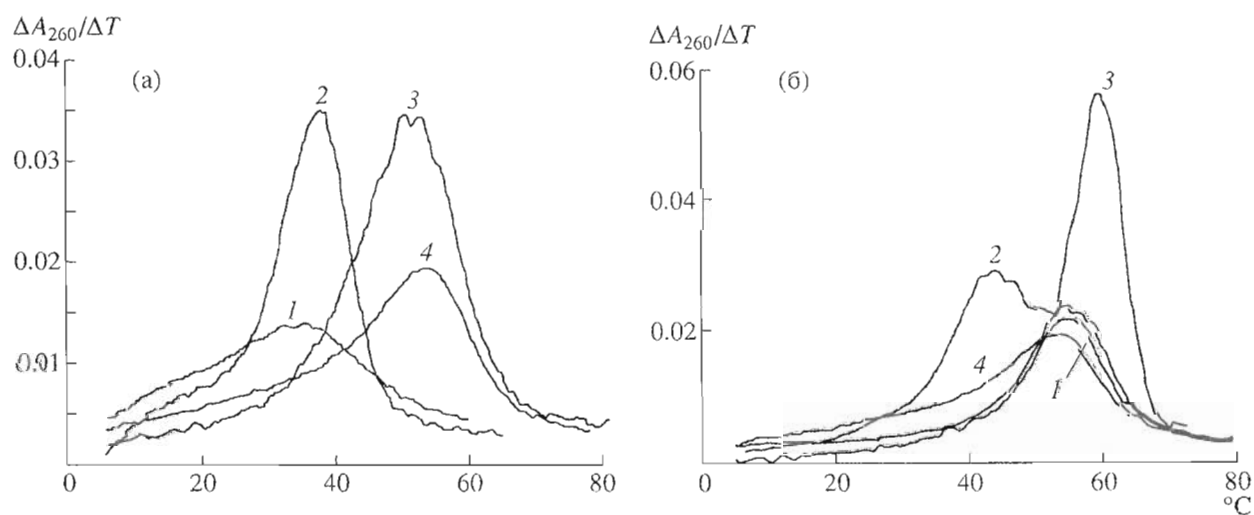


Рис. 2. Дифференциальные кривые термической денатурации комплексов $M \cdot pN_{12}$ (а) и $M \cdot pN_8$ (б) в отсутствие (1) и в присутствии эффекторов E2 (2), E2(Phn) (3); 4 – комплекс $M \cdot E2(Phn)$

тетрануклеотида, дуплекс $M \cdot pN_4$ может образовываться исключительно в составе тандемного комплекса.

Термостабильность тандемного комплекса $M \cdot pN_8 + E2$ несколько выше, чем для отдельных компонентов тандема при их независимом комплексообразовании (рис. 2а, 2). Равные комплексообразующие способности октануклеотида pN_8 и эффектора E2 обуславливают высокую вероятность существования при температурах выше температур плавления компонентов комплекса наряду с тандемным комплексом $M \cdot pN_8 + E2$ и независимых комплексов мишени M как с октануклеотидом pN_8 , так и с эффектором E2. Дифеназиниевый эффектор E2(Phn), обладающий большей гибридизационной способностью, чем нативный октануклеотид-эффектор E2, в большей степени стабилизирует комплекс $M \cdot pN_8$. Анализ дифференциальной кривой оптического плавления тандемного комплекса $M \cdot pN_8 + E2(Phn)$ (рис. 2а) позволяет предположить, что в присутствии дифеназиниевого эффектора температура плавления комплекса $M \cdot pN_8$ должна быть не менее 45°C. Различие в термостабильности комплексов $M \cdot pN_8$ в присутствии E2(Phn) и $M \cdot E2(Phn)$ должно приводить к преимущественному существованию дуплекса мишени и октануклеотида в составе тандемного комплекса.

Влияние октануклеотида-эффектора E2 на степень ассоциации додекануклеотида с мишенью незначительно, поскольку температура плавления комплекса $M \cdot pN_{12}$ много выше, чем комплекса $M \cdot E2$. В трехкомпонентной системе $M \cdot pN_{12} + E2$ плавление имеет двухфазный характер, обусловленный последовательным разрушением дуплекса, образованного E2 ($T_{пл} 38^\circ C$), а затем дуплекса, образованного pN_{12} ($T_{пл} 56^\circ C$) (рис. 2б, 2). При 20°C мишень существует преимущественно в виде тандемного комплекса $M \cdot pN_{12} + E2$, а при температуре выше 55°C образуется в основном комплекс с додекануклеотидом $M \cdot pN_{12}$ (рис. 2б, 2). В присутствии эффектора E2(Phn) комплексообразующая способность додекануклеотида pN_{12} несколько возрастает. Дифференциальная кривая плавления комплекса $M \cdot pN_{12} + E2(Phn)$ имеет один температурный максимум при 62°C (рис. 2б, 3), что свидетельствует о взаимной стабилизации комплексов компонентов тандема. В присутствии E2(Phn) мишень оказывается связанной как в тандемном комплексе $M \cdot pN_{12} + E2(Phn)$ (20–50°C), так и наряду с ним в комплексах $M \cdot pN_{12}$ и $M \cdot E2(Phn)$ при увеличении температуры.

Таким образом, в присутствии эффектора в зависимости от температуры и комплексообразующих свойств компонентов тандема олигонуклеотид+эффектор возможно образование как тандемных комплексов мишень · реагент + эф-

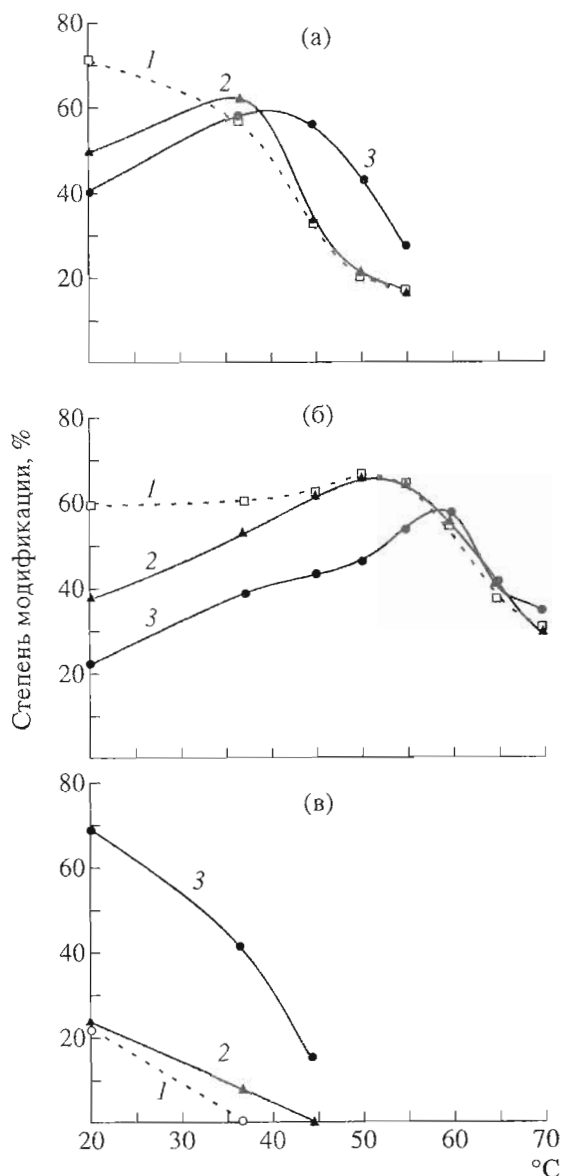


Рис. 3. Температурная зависимость степени модификации мишени M алкилирующими реагентами в составе комплексов: (а) – $M \cdot (RCl)pN_8$ (1), $M \cdot (RCl)pN_8 + E2$ (2), $M \cdot (RCl)pN_8 + E2(Phn)$ (3); (б) – $M \cdot (RCl)pN_{12}$ (1), $M \cdot (RCl)pN_{12} + E2$ (2), $M \cdot (RCl)pN_{12} + E2(Phn)$ (3); (в) – $M \cdot (RCl)pN_4 + E1(Phn)$ (1), $M \cdot (RCl)pN_4 + E2(Phn)$ (2), $M \cdot (RCl)pN_4 + E1(Phn) + E2(Phn)$ (3).

фектор, так и комплексов с отдельными компонентами тандема мишень · реагент или мишень · эффектор.

Влияние на модификацию мишени октануклеотида-эффектора E2

Хотя эффектор E2 незначительно стабилизирует комплексы $M \cdot pN_8$ и $M \cdot pN_{12}$, он существенно влияет на характер модификации мишени алкилирующими производными этих олигонуклео-

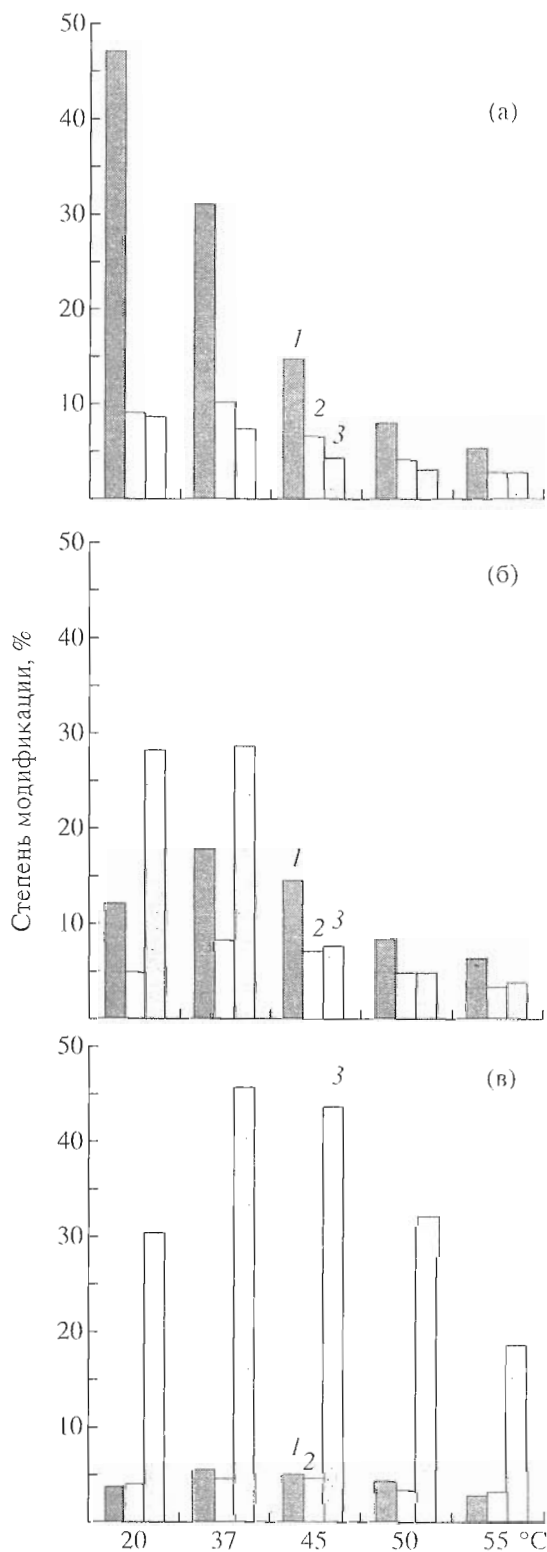


Рис. 4. Степень модификации оснований мишени C¹³ (1), G¹² (2), G⁹ (3) реагентом (RCl)pN₈ при разных температурах в комплексах в отсутствие (а) и в присутствии эффектора E2 (б), E2(Phn) (в).

тидов. Температурные зависимости степени модификации мишени как (RCl)pN₈, так и (RCl)pN₁₂ в присутствии E2 имеют аномальный характер с максимумом в районе температур плавления соответствующих комплексов мишень · реагент (рис. 3а, рис. 3б). При 20–37 °С, когда вероятность образования тандемных комплексов M · (RCl)pN_n + E2 (n = 8, 12) велика, наблюдается снижение эффективности модификации мишени и резкое изменение направленности алкилирования: основным сайтом модификации становится основание мишени G⁹ (рис. 4, 5). При температурах выше 45 °С степень и направленность алкилирования мишени реагентами (RCl)pN₈ и (RCl)pN₁₂ в присутствии эффектора E2 практически совпадают с таковыми при модификации в соответствующих независимых комплексах M · (RCl)pN_n (рис. 4, 5).

Влияние на модификацию мишени дифеназиниевого эффектора E2(Phn)

Степень модификации мишени тетрауклеотидным реагентом (RCl)pN₄ при добавлении эффектора E2(Phn) возрастает от 0 до 24% при 20 °С и от 0 до 8% при 37 °С. Еще большее увеличение степени модификации (до 70 и 42% соответственно) наблюдается при переходе от комплекса M · (RCl)pN₄ + E1(Phn) к комплексу M · E2(Phn) + (RCl)pN₄ + E1(Phn) (таблица, рис. 3в). Во всех случаях, как в отсутствие эффектора E2(Phn), так и в его присутствии, тетрауклеотидный реагент модифицирует мишень только по основанию G⁹, принимающему участие в образовании дуплекса мишень · реагент. Таким образом, эффектор, примыкающий к тетрауклеотидному реагенту со стороны реакционноспособной группировки, повышает эффективность модификации мишени и не влияет на направленность алкилирования.

Кривая температурной зависимости степени модификации мишени реагентом (RCl)pN₈ в присутствии E2(Phn) имеет аномальный характер, как и в случае использования эффектора E2, однако температурный максимум алкилирования регистрируется при 40–45 °С (рис. 3а). В области низких температур (20–37 °С) эффективность модификации мишени M падает по сравнению с комплексами M · (RCl)pN₈ и M · (RCl)pN₈ + E2, однако в отличие от эффектора E2 дифеназиниевое производное E2(Phn) повышает эффективность действия реагента (RCl)pN₈ при температурах выше 37 °С. Во всем интервале температур алкилированию подвергается практически лишь основание мишени G⁹ (рис. 4в).

Температурный максимум алкилирования мишени реагентом (RCl)pN₁₂ в присутствии дифеназиниевого эффектора сдвигается до 60 °С, а максимальная степень модификации при этой температуре составляет только 58% (рис. 3б). При 20 °С

степень модификации в тандемном комплексе $M \cdot (RCl)pN_{12} + E2(Phn)$ падает практически на 40% по сравнению со степенью модификации в комплексе $M \cdot (RCl)pN_{12}$ и на 20% по сравнению с системой $M \cdot (RCl)pN_{12} + E2$. Основным сайтом модификации мишени реагентом $(RCl)pN_{12}$ в присутствии $E2(Phn)$ является основание мишени G^9 (рис. 5в), однако с увеличением температуры его доля в суммарной степени модификации уменьшается и возрастает доля модификации оснований C^{13} и G^{12} , алкилирование по которым характерно для модификации из комплекса в отсутствие эффектора (рис. 5в).

Таким образом, влияние эффекторов двух типов ($E2$ и $E2(Phn)$) на модификацию мишени реагентами с высокими комплексообразующими свойствами носит однотипный характер. Различия в степени их влияния при одной температуре обусловлены различной термостабильностью их комплексов с мишенью и, следовательно, разной степенью связывания мишени в тандемном комплексе. Резкое различие сайтов модификации в тандемном комплексе мишень · реагент + эффектор (G^9) и комплексе мишень · реагент (C^{13}) позволяет оценить долю тандемного и нетандемного комплекса при определенной температуре. Более высокая степень модификации мишени реагентами $(RCl)pN_8$ и $(RCl)pN_{12}$ при $20^\circ C$ в присутствии $E2$ по сравнению с реакцией в присутствии $E2(Phn)$, очевидно, связана с большей долей реакции, протекающей в независимом комплексе мишень · реагент, поскольку различие в степени модификации обусловлено главным образом алкилированием основания мишени C^{13} . Можно предположить, что падение степени модификации и изменение направленности алкилирования в присутствии эффекторов вызываются именно образованием дуплекса мишень · эффектор, а остаток феназина в эффекторе $E2(Phn)$ не вносит дополнительных затруднений в процесс модификации.

Уменьшение числа мест модификации ДНК-мишени алкилирующим реагентом в присутствии дифеназиниевого эффектора отмечалось ранее при формировании в тандемном комплексе другого реакционного узла [15, 16].

Полученные результаты показывают, что эффекторы повышают степень модификации при использовании реагентов с низкими гибридными свойствами. В то же время образование тандемных комплексов мишень · эффектор + реагент при модификации мишени реагентами, обладающими высокой комплексообразующей способностью, может приводить к появлению температурного максимума эффективности модификации в области температуры плавления комплекса мишень · реагент (в присутствии эффектора) и изменению позиционной направлен-

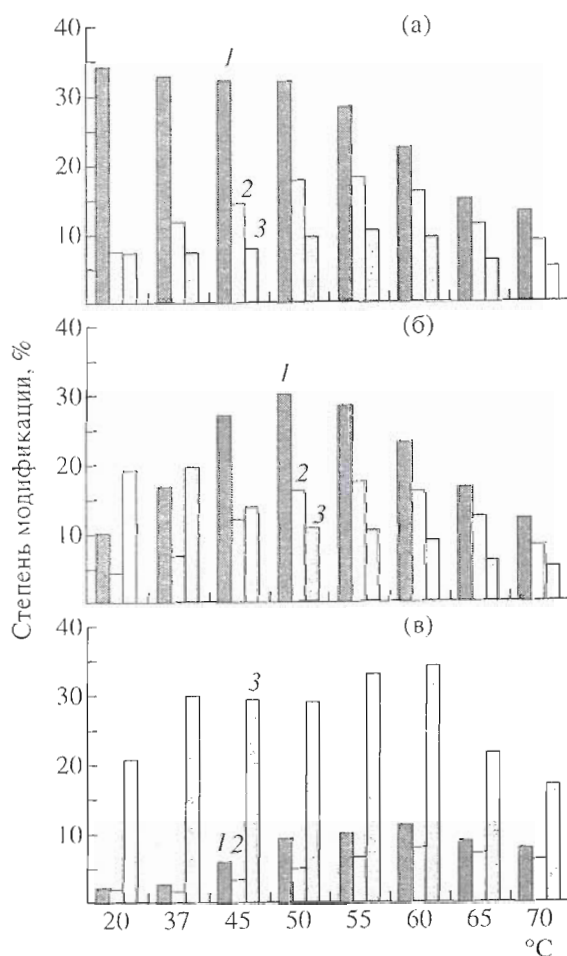


Рис. 5. Степень модификации оснований мишени C^{13} (1), G^{12} (2), G^9 (3) реагентом $(RCl)pN_{12}$ при разных температурах в комплексах в отсутствие (а) и в присутствии эффектора $E2$ (б), $E2(Phn)$ (в).

ности реакции. Падение эффективности модификации мишени при температурах ниже температуры плавления комплекса мишени и реагента свидетельствует о том, что в условиях высокой степени связывания мишени с реагентом эффектор препятствует модификации мишени. В случае использования реагента и эффектора с близкой способностью к комплексообразованию наличие температурного максимума модификации мишени вызвано снижением доли модификации в низкоэффективном тандемном комплексе мишень · реагент + эффектор за счет его диспропорционирования при повышении температуры и повышении доли реакции в более эффективном независимом комплексе мишень · реагент.

Поскольку во всех исследуемых комплексах реакционный узел остается постоянным, разное влияние эффектора на модификацию мишени реагентами с различающимися гибридными свойствами может быть обусловлено конформа-

ционными особенностями дуплексов мишень · реагент. В работе [1] было показано, что направленность и эффективность модификации мишени в отсутствие эффектора обусловлены жесткостью структуры комплекса реагент · мишень и зависят от гибридизационных свойств реагента. В случае тетрауклеотидного реагента, образующего с мишенью комплекс с наименее жесткой структурой, модификация протекает во внутридуплексному основанию мишени G⁹ из предреакционного состояния конформации T2, требующего локального изменения дуплексного участка. Комплексы мишени с реагентами на основе окта- и додекануклеотидов конформационно более жесткие, поэтому алкилирование внутридуплексных оснований мишени G⁹ и G¹² реагентами (RCl)pN₈ и (RCl)pN₁₂ из предреакционного состояния конформации T2 оказывается маловероятным. Модификация подвергается преимущественно основание мишени C¹³ из предреакционного состояния конформации T1, переход в которое характеризуется низким энергетическим барьером.

В согласии с расчетами, проведенными в работах [17, 18], в присутствии эффекторов E2 или E2(Phn) изменение направленности модификации мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов (окта- и додекамеры), обладающими относительно высокими комплексообразующими свойствами, может быть вызвано тем, что формирование дуплекса эффектора с мишенью по соседству с алкилирующей группировкой приводит к запрещению конформации T1, благоприятствующей алкилированию основания мишени C¹³ в комплексе M · (RCl)pN_n (n = 8, 12) и способствует реализации конформации T2, обеспечивающей алкилирование основания G⁹. Однако из-за высокой кооперативности структуры дуплекса реакционная группировка “замораживается” в конформации-накопителе T2, вероятность преодоления энергетического барьера перехода в предреакционное состояние мала. Вследствие этого низка и эффективность модификации основания мишени G⁹ в tandemных комплексах при относительно низких температурах, когда степень ассоциации мишени и реагента близка к 1. С повышением температуры жесткость структуры комплекса мишень · реагент уменьшается и вероятность перехода в предреакционное состояние возрастает, что приводит к увеличению эффективности модификации мишени при использовании (RCl)pN₈ и (RCl)pN₁₂ в присутствии E2(Phn).

В случае коротких олигонуклеотидов, таких, как тетрауклеотид, образующих с мишенью дуплексы с подвижной низкокооперативной структурой, конформация T2 характеризуется низким барьером перехода в предреакционное состояние. Поэтому вероятность модификации по внутреннему основанию G⁹ высока и при низких

температурах. Присутствие эффектора не препятствует модификации мишени тетрауклеотидным реагентом, а, наоборот, значительно усиливает ее за счет увеличения степени ассоциации мишени с тетрауклеотидом в tandemном комплексе с эффектором. Аналогичное влияние эффектор оказывает и на модификацию мишени реагентом (RCl)pN₈* с низкой гибридизационной способностью, последовательность которого содержит основание A⁴, некомплементарное звену мишени G⁹. В отсутствие эффектора этот реагент с очень низкой эффективностью алкилирует основание мишени C¹³ (конформация T1). В tandemном комплексе с эффектором главным сайтом модификации становится основание G⁹ (конформация T2). Наличие в комплексе некомплементарной пары, вызывающей локальные нарушения в двойной спирали дуплекса, способствует эффективному алкилированию мишени в присутствии эффектора.

Таким образом, в tandemных системах эффектор, находясь в непосредственной близости от реакционной группировки реагента, образующего с мишенью стабильный комплекс, двояким образом влияет на взаимодействие мишени и реагента. С одной стороны, он увеличивает стабильность комплекса реагент · ДНК-мишень, с другой – изменяет направленность алкилирования и снижает эффективность модификации мишени при температурах ниже температуры плавления комплекса реагент · мишень (когда степень ассоциации мишени с реагентом близка к 1). В случае олигонуклеотидных реагентов, образующих слабые комплексы с мишенью, эффекторы способствуют как повышению стабильности комплекса мишень · реагент, так и увеличению степени алкилирования мишени реагентом во всем исследованном температурном диапазоне.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

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

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

Олигонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе по [19].

Дифеназиновые производные олигонуклеотидов (PhnL)_nГССАGGCАp(LPhn) и (PhnL)_nGCАТ-САAGp(LPhn) (соответственно E₁(PhnL) и E₂(Phn)) синтезировали по методу [10] и анализировали методом обращенно-фазовой хроматографии (ко-

лонка 4×250 мм, линейный градиент $0 \rightarrow 20\%$ ацетонитрила в 0.05 M LiClO₄ за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), сравнивая времена удерживания исходных олигонуклеотидов и более гидрофобных продуктов реакции ($\Delta t_{уд}$ – время удерживания относительно исходного олигонуклеотида), а также спектрофотометрически по соотношению поглощения растворов целевых продуктов в воде при длинах волн 260 и 530 нм (ϵ_{530} феназиниевого остатка с аминоклином составляет 1.4×10^4 M⁻¹см⁻¹ [10]). Для Е1: $\Delta t_{уд} = 11$ мин, $A_{260}/A_{530} = 3.6$; для Е2: $\Delta t_{уд} = 10$ мин, $A_{260}/A_{530} = 3.5$.

Алкилирующие производные олигонуклеотидов (RCI)_nN_n получали по методу [20] и выделяли обращенно-фазовой хроматографией (условия см. выше), сравнивая времена удерживания исходных олигонуклеотидов и более гидрофобных продуктов реакции. Содержание активного хлора в олигонуклеотидных реагентах определяли по реакции алкилирования тиосульфата [21], выход которой, по данным обращенно-фазовой хроматографии, во всех случаях превышал 90%.

Концентрацию олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины ϵ_{260} (M⁻¹см⁻¹) моно- и динуклеотидов [22], алкилирующей группировки (1.47×10^4 [23]) и N-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка (1.0×10^4 [10]).

Термическую денатурацию олигонуклеотидных дуплексов исследовали в буфере 0.1 M NaCl, 0.01 M какодилат натрия (рН 7.4), 1 mM EDTA (концентрация каждого олигонуклеотидного компонента 1.3×10^{-5} M) на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа "Миличром" (Россия) при длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин.

5'-³²P-Меченый олигодезоксирибонуклеотид M получали путем обмена 5'-фосфата на [³²P]фосфат [24].

Модификацию ДНК-мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов проводили при температурах 20 (48 ч), 37 (8 ч), 45 (2 ч), 50 (1 ч), 55 (35 мин), 60 (20 мин), 65 (12 мин) и 70°C (7 мин) (более пяти периодов полуионизации связи C–C1 [23]).

Алкилирование мишени регистрировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ по появлению продуктов деструкции олигонуклеотидной цепи по модифицированным основаниям после обработки препаратов мишени 10% водным пиперидином в течение 30–50 мин при 95°C [25]. Аддукт ковалентного присоединения реагента по основанию мишени C¹³, устойчивый к обработке пиперидином, предварительно обрабатывали гидразингидратом для расщепления модифицированной мишени по алкилированному основанию C¹³ (данные не приведены) [25].

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 (A + G) получали обработкой препарата ДНК 2% раствором дифениламина в 66% муравьиной кислоте (25°C, 35 мин) [26].

Авторы выражают благодарность академику Д.Г. Кнорре за проявленный к работе интерес и полезную дискуссию.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пышный Д.В., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 131–137.
2. Pieters J.M.L., Mans R.M.V., van den Elst H., van der Marel G.A., van Boom J.H., Altona C. // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 4551–4556.
3. Лохов С.Г., Кошкин А.А., Кутявин И.В., Мутякин М.П., Подыминогин М.А., Лебедев А.В. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 197–205.
4. Goodchild J. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. P. 4607–4612.
5. Pascolo E., Hudrisier D., Sproat B., Thuong N.T., Toulme J.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1219. P. 98–106.
6. Kieleczawa J., Dunn J.J., Studier F.W. // Science. 1992. V. 258. P. 1787–1791.
7. Ажикина Т.Л., Потапов В.К., Веселовская С.В., Мясников В.А., Свердлов Е.Д. // Докл. РАН. 1993. Т. 331. С. 751–753.
8. Кнорре Д.Г., Пышный Д.В., Иванова Е.М., Бондарь А.А., Морозов И.В., Мертецов Н.П., Зарытова В.Ф. // Докл. РАН. 1997. Т. 350. С. 119–120.
9. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Докл. РАН. 1995. Т. 344. С. 122–125.
10. Lokhov S.G., Podyminogin 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.
11. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 895–900.
12. Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A., Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Ivanova E.M., Zarytova V.F. // Pure Appl. Chem. 1996. V. 68. P. 1321–1328.
13. Воробьев П.Е., Маркушин Ю.Я., Сергеев Д.С., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 111–116.
14. Табатадзе Д.Р., Третьякова Л.В., Левина А.С., Пышный Д.В., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 642–647.

15. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1653–1660.
16. Fedorova O.S., Adeenah-Zadah A., Bichenkova E.V., Knorre D.G. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1995. V. 13. P. 145–166.
17. Воробьев Ю.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 69–82.
18. Воробьев Ю.Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 197–210.
19. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
20. Zarytova V.F., Godovikova T.S., Kutuyavin I.V., Khalimskaya L.M. // Biophosphates and their Analogues, Synthesis, Structure, Metabolism and Activity / Eds K.S. Bruzik, W.S. Stec. Amsterdam: Elsevier, 1987. P. 149–164.
21. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тугеева Н.Г., Чимитова А.Т. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
22. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
23. Барам Г.И., Бунева В.Н., Добрикова Е.Ю., Петров В.Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 613–620.
24. Berkner K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3184.
25. Махат А.М., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
26. Коробко В.Г., Грачев С.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1420–1422.

Interaction of Derivatives of Short Oligonucleotides with Nucleic Acids.

VIII. Some Features of Modification of Target DNA

by Alkylating Oligonucleotide Derivatives in Tandem Complexes

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

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

The influence of effectors [octanucleotides and their 3',5'-di-N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives] on the modification of a target DNA by alkylating oligonucleotide derivatives forming duplexes of different stability with the target was studied. It is shown that, being in tandem complexes immediately adjacent to the reactive group of an oligonucleotide reagent possessing a high hybridization capacity, the effector, on the one hand, enhances the stability of the reagent · target duplex, and on the other hand, changes the site-specificity of alkylation and decreases the efficiency of the target modification at temperatures that provide a high extent of the target association with the reagent. Conversely, in the case of oligonucleotide reagents forming weak complexes with the target, effectors enhance both the stability of the target · reagent duplex and the extent of the target throughout the temperature range tested. The data indicate that the varying influence of effectors on the target modification by reagents with different hybridization capacities is due to conformational features of the target · reagent duplexed regions. Increasing the rigidity of the target · reagent duplex reduces the efficiency of the target modification in tandem complexes.

Key words: oligonucleotides, reactive derivatives; DNA modification; tandem complexes, thermodynamic stability, effectors