



УДК 577.113.4(+7):577.152.31*264'14:543.422.25

РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК В СОСТАВЕ ГИБРИДНЫХ ДУПЛЕКСОВ РИБОНУКЛЕАЗОЙ Н *E. coli* III. СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ ДУПЛЕКСОВ РНК И ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК БЛЕОМИЦИНА А₅

© 2002 г. П. Е. Воробьев*, Д. В. Пышный*, Э. Викстром**, В. Ф. Зарытова**

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

**Университет Томаса Джефферсона, Филадельфия, Пенсильвания, США

Поступила в редакцию 21.05.2001 г. Принята к печати 04.10.2001 г.

Исследовано влияние остатка блеомицина А₅, ковалентно присоединенного к 4-, 8- и 12-звенным олигодезоксирибонуклеотидам, на субстратные свойства образуемых ими непрерывных и тандемных (в присутствии немодифицированных октануклеотидных эффекторов) гибридных дуплексов. Показано, что блеомициновые производные олигодезоксирибонуклеотидов формируют гибридные дуплексы, обладающие практически такой же термостабильностью, что и немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды. РНК в составе гибридных дуплексов, содержащих остаток блеомицина, гидролизует РНКазой Н *E. coli*, однако начальная скорость гидролиза (v_0) в случае непрерывных гетеродуплексов снижена в 2.6–3.4 раза. Сделано предположение, что основной причиной ингибирующего действия остатка блеомицина являются стерические факторы. В меньшей степени влияние блеомицина на v_0 проявляется в случае тандемных гибридных комплексов. Вероятно, субстратные свойства таких гибридных дуплексов в основном определяются эффекторами. Из всех исследованных тандемных систем блеомициновое производное тетрануклеотида, фланкированное двумя эффекторами, формирует с РНК гибридный дуплекс с наилучшими субстратными свойствами.

Ключевые слова: блеомициновые производные олигонуклеотидов; рибонуклеаза Н.

ВВЕДЕНИЕ

Более 30 лет ведется интенсивный поиск реакционноспособных производных олигонуклеотидов, способных к эффективному и сайт-направленному взаимодействию с нуклеиновыми кислотами (НК) *in vitro* и *in vivo* [2–5]. К настоящему времени получен широкий спектр производных олигонуклеотидов для использования при искусственной регуляции экспрессии генов. В перспективе такие производные могут стать основой терапевтических средств нового поколения, способных селективно воздействовать на генетический материал. Большинство известных реакционноспособных производных олигонуклеотидов реагирует с НК однократно, после чего полностью теряют свою активность. Более перспективно использование химически активных группировок, теоретически способных многократно расщеплять НК. С этой целью были получены производные олигонуклеотидов, несущие металлокомплексные группиров-

ки, такие, как Fe-EDTA [6], Cu-фенантролин [7], металлопорфирины [8]. Эти соединения катализируют реакции окисления органических субстратов и обладают потенциальной способностью к многократной деструкции НК. Однако, как оказалось, они быстро деградируют в растворе с потерей реакционной способности. Вследствие этого эффективность модификации такими олигонуклеотидными реагентами даже при использовании избытка по отношению к НК-мишени и сохранении олигонуклеотидной части реагента не превышает 20–50%.

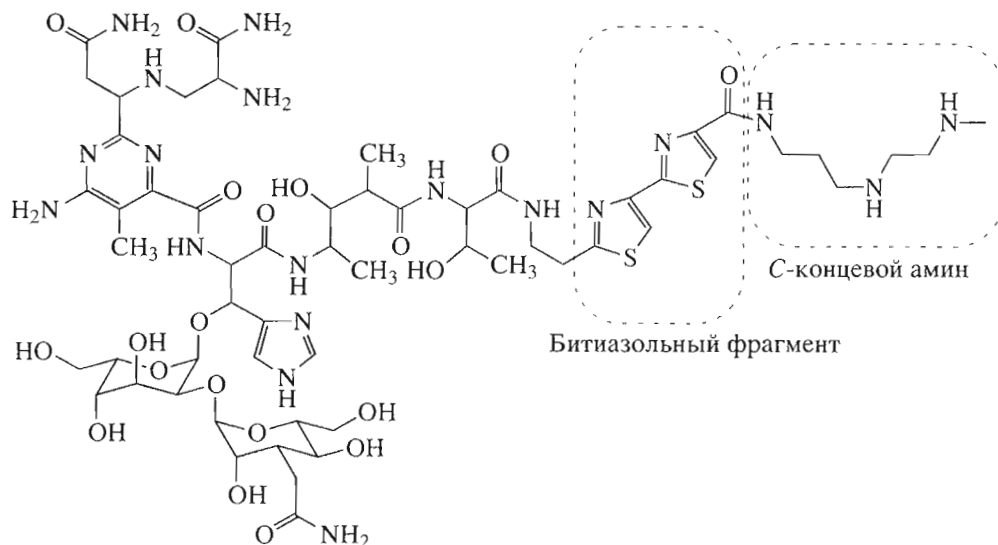
Среди всего спектра существующих модифицированных олигонуклеотидов особое место занимают производные, несущие остаток антибиотика блеомицина А₅. На сегодняшний день это единственные производные олигонуклеотидов, способные сайт-специфически [9] и в каталитическом режиме [10] вызывать деструкцию одноцепочечных ДНК. Кроме того, такие производные эффективно разрушают двуцепочечные ДНК [11].

Блеомициновые производные олигонуклеотидов особенно эффективны в тандемных системах, где они фланкированы олигонуклеотидами-эф-

Сообщение II см. [1].

#Автор для переписки (эл. почта: zarytova@niboch.nsc.ru; тел.: (3832) 396224).

Blm –



Структура остатка блеомицина A₅.

фекторами. Нами было показано [12], что в таких системах один остаток блеомицина способен вызывать деструкцию шести и более молекул ДНК-мишени. Хотя в качестве основной мишени для блеомициновых производных олигонуклеотидов рассматривалась ДНК, весьма вероятно, что *in vivo* они могут проявлять аналогичные свойства, взаимодействуя и с мРНК. Эффективность анти-смысловых олигонуклеотидов зачастую прямо связана с их способностью стимулировать гидролиз матричных РНК рибонуклеазой Н в составе образованных гибридных дуплексов [13]. Это побуждает к изучению влияния вносимых модификаций на субстратные свойства образуемых гибридных дуплексов.

Цель данной работы – исследование влияния остатка блеомицина в составе олигодезоксирибонуклеотидов на субстратные свойства образуемых ими гибридных дуплексов (схема 1) по отношению к рибонуклеазе Н *E. coli*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В сообщении [14] мы показали, что процесс гидролиза РНК рибонуклеазой Н в тандемных дуплексах может протекать иначе, чем в непрерывных. В данной работе исследовано влияние блеомицина на гидролиз РНК как в непрерывных (комплексы 1–4), так и в тандемных (комплексы 5, 6, 8, 9) гибридных дуплексах. В качестве РНК-мишени использовали ³²P-меченый 20-звенный олигорибонуклеотид. Продукты гидролиза РНК анализировали гель-электрофорезом в денатурирующих условиях (см. “Эксперимент. часть”).

Исследование влияния остатка блеомицина, ковалентно присоединенного по 5'-фосфатной группе олигодезоксирибонуклеотидов, было проведено в условиях полного связывания РНК исследуемыми соединениями. В этом случае различия в начальных скоростях гидролиза РНК (v_0) отражают различия в субстратных свойствах гибридных дуплексов. Как видно из таблицы, значения температур плавления непрерывных и тандемных комплементарных комплексов достаточно высоки. Исходя из этих данных, можно считать, что степень ассоциации таких комплексов при 20°C должна быть близка к полной даже при переходе к более низким концентрациям компонентов [15]. Поэтому влияние остатка блеомицина на субстратные свойства гибридных дуплексов оценивали по начальной скорости гидролиза рибо-

Температуры плавления гибридных комплексов

Комплекс	ДНК-цепь	$T_{пл}, ^\circ C^*$
1	<i>pN</i> ₈	48
2	<i>BlmpN</i> ₈	48
3	<i>pN</i> ₁₂	67
4	<i>BlmpN</i> ₁₂	67
8	<i>pN</i> ₈ (e2) + <i>BlmpN</i> ₄ + <i>pN</i> ₈ (e1)	36, 53, 40
9	<i>pN</i> ₈ (e2) + <i>pN</i> ₄ + <i>pN</i> ₈ (e1)	39, 53, 40

* Для комплексов 8 и 9 три последовательных числа указывают температуры плавления комплексов, образованных *BlmpN*₄ (для 8) и *pN*₄ (для 9) в присутствии эффекторов e1 и e2; комплекса, образованного e1; комплекса, образованного e2. Условия см. “Эксперимент. часть”.

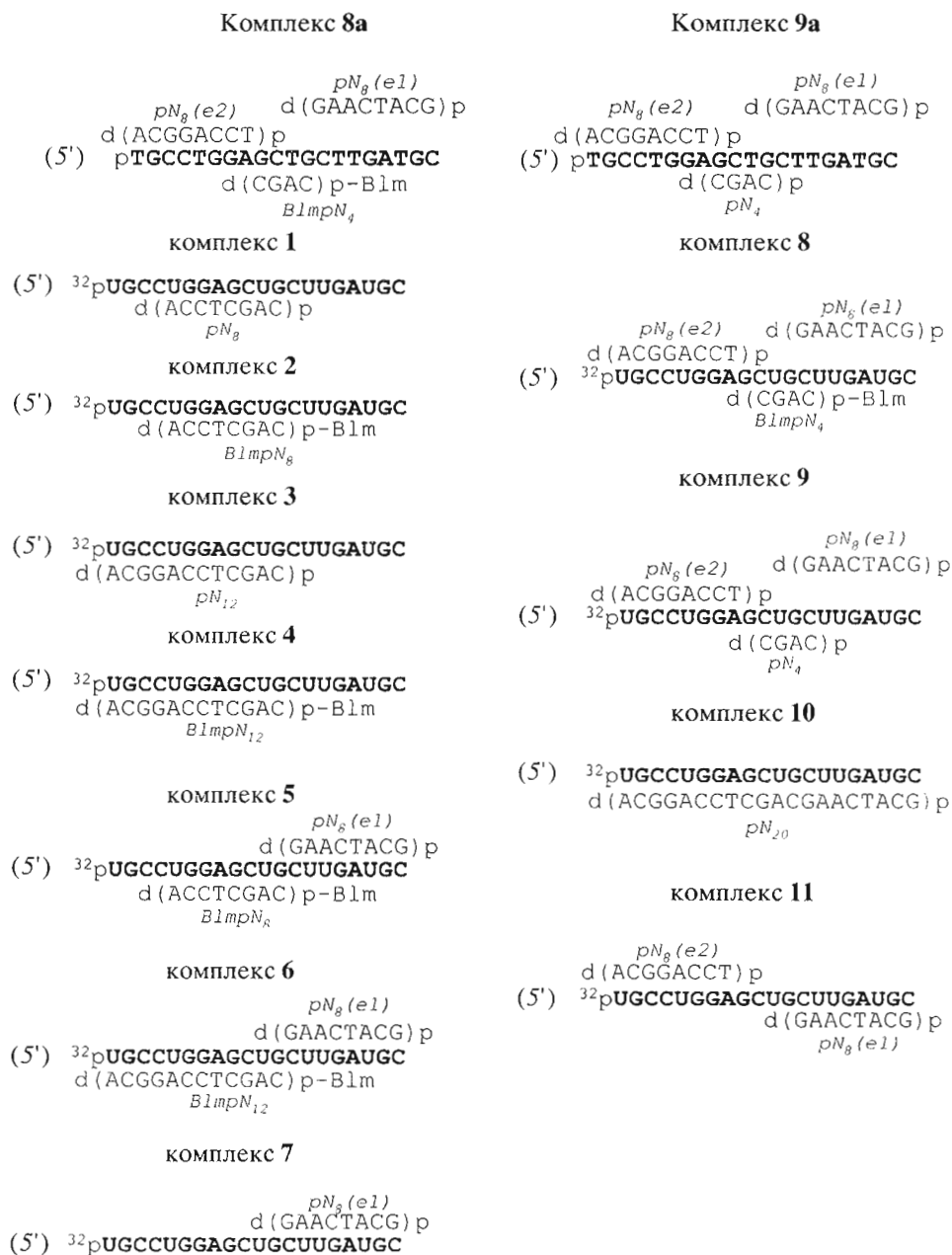


Схема 1.

нуклеазой Н 20-звенной РНК при 20°C, т.е. в условиях ее полного связывания.

Как следует из данных, представленных на рис. 1а–е, все исследованные блеомицинсодержащие олигонуклеотиды стимулируют гидролиз РНК как в непрерывных (комплексы 1–4), так и в тандемных (комплексы 5, 6, 8, 9) гибридных дуплексах. Однако влияние остатка блеомицина проявляется в этих комплексах по-разному.

При расщеплении РНК в дуплексах с 12-мерами (комплексы 3 и 4) регистрируются три основных продукта, соответствующих гидролизу фос-

фодиэфирных связей U11–G12 (p11), A8–G9 (p8) и U5–G6 (p5), в то время как при гидролизе в дуплексах с 8-мерами (комплексы 1 и 2) наблюдается лишь один основной продукт – p11 (рис. 1а). Эти данные позволяют заключить, что присоединение остатка блеомицина к олигонуклеотидам не оказывает существенного влияния на позиционную направленность расщепления РНК в составе непрерывных гибридных комплексов с такими нуклеотидами.

Из данных, приведенных на рис. 1в, видно, что начальная скорость гидролиза РНК в комплексах с 12-мерами (как с немодифицированным (дуп-

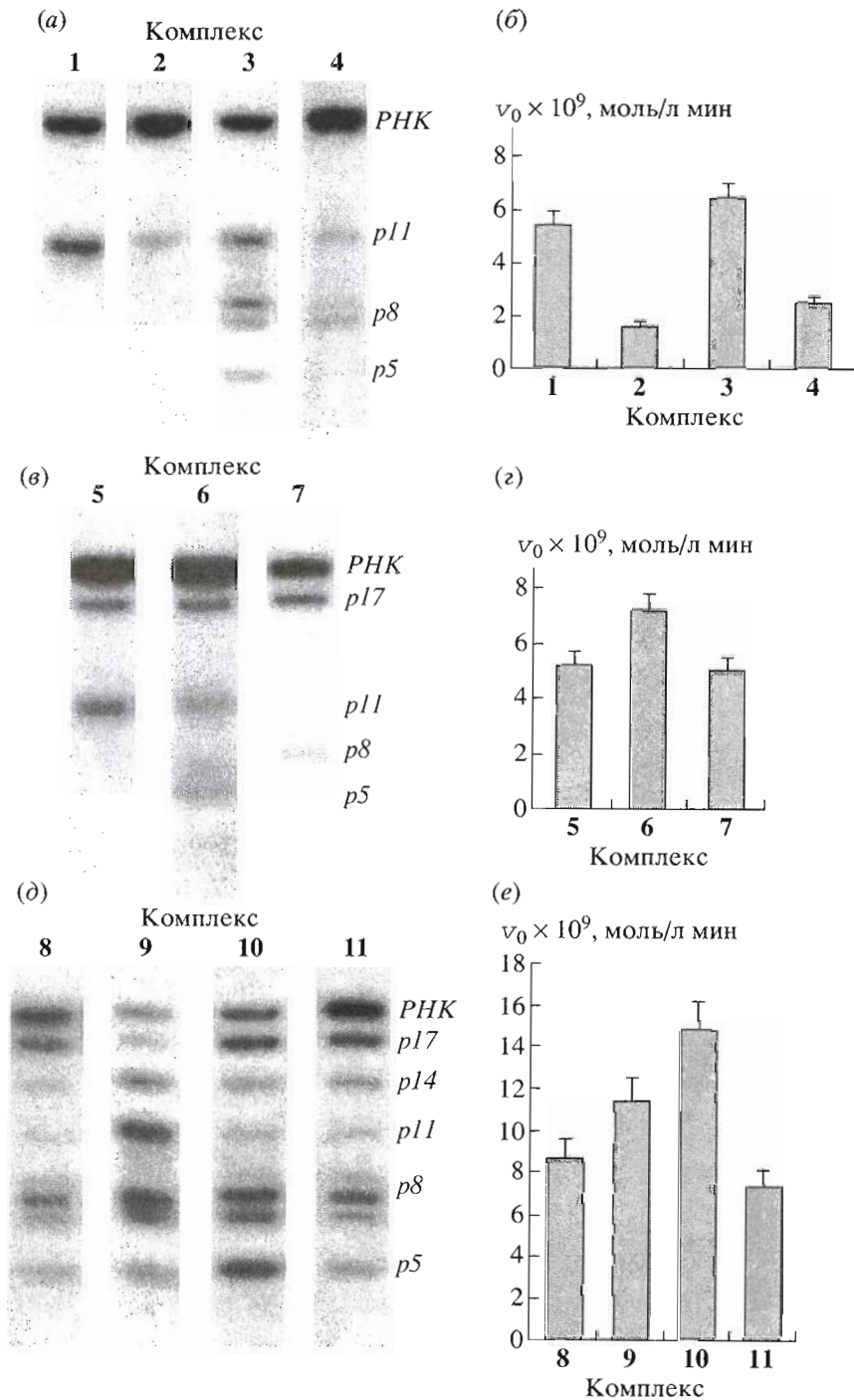


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов гидролиза (а), (б), (в) через 15 мин после начала реакции и начальная скорость гидролиза v_0 (z), (d), (e) РНК с помощью рибонуклеазы Н в комплексах 1–11. Условия см. “Эксперимент. часть”.

лекс 3), так и с блеомицинсодержащим (4)) несколько выше, чем в комплексах с соответствующими 8-мерами. По-видимому, это обусловлено большей протяженностью гибридного дуплекса в случае 12-меров. В комплексах 2 и 4, образованных с участием $BtmpN_8$ и $BtmpN_{12}$, значения v_0 в 3.4 и 2.6 раза ниже, чем в соответствующих ком-

плексах 1 и 3, образованных с участием немодифицированных олигонуклеотидов pN_8 и pN_{12} . Сравнение начальных скоростей гидролиза РНК в комплексах 1 и 2 (а также 3 и 4) показывает, что введение остатка блеомицина по 5'-концу олигодезоксирибонуклеотида, участвующего в образовании непрерывного гибридного дуплекса, приводит

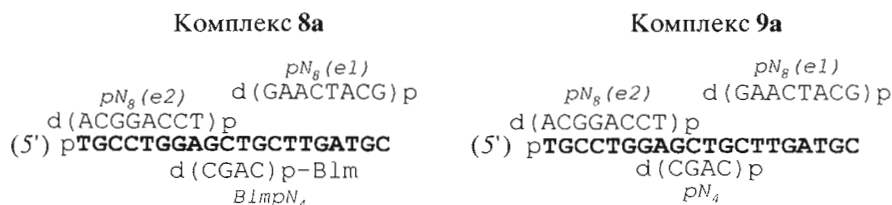


Схема 2.

к заметному ухудшению субстратных свойств последнего по отношению к РНКазе Н (рис. 1б).

Это влияние блеомицина может быть обусловлено различными причинами, например, его встраиванием в гибридный дуплекс или возникающими стерическими затруднениями. Известно, что именно встраивание битиазольного остатка в малую бороздку *B*-формы обеспечивает эффективное связывание блеомицина с ДНК-дуплексом [16]. Существующие модели взаимодействия неконъюгированного блеомицина с двуцепочечной ДНК предполагают частичную интеркаляцию битиазольного остатка и расположение металлсвязывающего центра антибиотика в малой бороздке ДНК [17]. При сравнении термической денатурации гибридных и ДНК-дуплексов (как немодифицированных, так и содержащих ковалентно связанный остаток блеомицина) становится ясно, что взаимодействие блеомицина с гибридными дуплексами может протекать иначе, чем с двуцепочечной ДНК. Оказалось, что совпадают значения $T_{пл}$ комплексов, образованных блеомицинсодержащим и немодифицированным тетрауклеотидом с ДНК-аналогом РНК-матрицы в присутствии

октануклеотидных эффекторов (в комплексах **8a** и **9a** (схема 2) – ДНК-аналогах гибридных комплексов **8** и **9**).

Напротив, комплекс, образованный блеомициновым производным тетрауклеотида с РНК в присутствии эффекторов, имеет $T_{пл}$ на 3°C ниже, чем комплекс, образованный немодифицированным тетрауклеотидом (см. таблицу).

Более существенные отличия обнаружены при термической денатурации дуплексов **8** и **8a**. В случае ДНК-дуплекса **8a** на длинах волн 300–320 нм, где регистрируется поглощение блеомицинового остатка, выявлен выраженный переход в интервале температур 20–45°C (рис. 2, кривые 1 и 2). В том же интервале температур регистрируется переход при 270 нм (рис. 2, кривая 3), соответствующий кооперативной денатурации тандемного комплекса с участием блеомицинсодержащего тетрауклеотида с ДНК. При термической денатурации гибридного дуплекса **8** переход при 300 нм отсутствует (рис. 2, кривая 4). Наличие такого перехода при термической денатурации комплекса **8a** является, по-видимому, следствием батохромного сдвига соответствующей полосы ($\lambda_{max} \approx 310$ нм [18, 19]) в спектре поглощения блеомицина при его взаимодействии с ДНК-дуплексом.

Этот сдвиг приводит к тому, что при термической денатурации комплекса **8a** наблюдается повышение оптической плотности при λ 300 нм (рис. 2, кривая 1) и снижение при λ 320 нм (рис. 2, кривая 2). Учитывая, что полоса с $\lambda_{max} \approx 310$ нм соответствует поглощению битиазольного фрагмента блеомицина, логично предположить, что отсутствие подобного перехода в интегральной кривой термической денатурации комплекса **8** при 300 нм (рис. 2, кривая 4) свидетельствует об отсутствии взаимодействия битиазольного остатка блеомицина с гибридным дуплексом. В случае гибридного дуплекса, приближающегося по основным параметрам к *A*-форме [20], взаимодействие с дуплексом битиазольного фрагмента, а следовательно, и всего остатка блеомицина, практически невозможно [21]. Отсутствие влияния концевой остатка блеомицина на стабильность комплексов **2** и **4** (см. таблицу) дополнительно свидетельствует в пользу этого предположения. Таким образом, в качестве основной причины негативного влияния остатка блеомицина на субст-

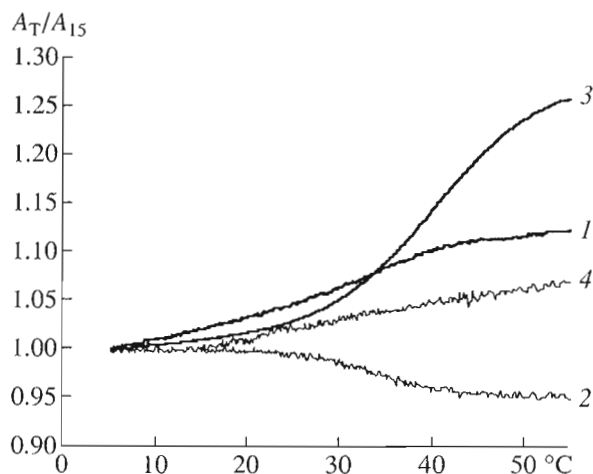


Рис. 2. Изменение нормированного оптического поглощения A_T/A_{15} при термической денатурации ДНК/ДНК-комплекса **8a** на длинах волн 300 (1), 320 (2), 270 нм (3) и гибридного РНК/ДНК-комплекса **8** на длине волны 300 нм (4). A_T и A_{15} – оптическое поглощение при данной температуре и при 15°C. Условия см. “Эксперимент. часть”.

ратные свойства гибридных дуплексов по отношению к РНКазе Н можно рассматривать прежде всего стерические факторы.

Другой возможной причиной ухудшения субстратных свойств может являться 5'-концевое расположение остатка блеомицина в составе олигонуклеотида. Ранее отмечалось [14, 22], что первичным сайтом атаки фермента, как правило, служит 3'-конец РНК. Также отмечалось [23], что наличие на 5'-конце олигодезоксирибонуклеотида фосфатной группы существенно увеличивает эффективность расщепления РНК в гибридном дуплексе. Блокирование 5'-концевой фосфатной группы остатком блеомицина (присоединяемого за С-концевой амин [24]) также может быть причиной ухудшения субстратных свойств гибридного дуплекса.

Снижение субстратных свойств гибридных дуплексов практически нивелируется при переходе от непрерывных блеомицинсодержащих комплексов **2** и **4** (рис. 1а,б) к тандемным **5** и **6** (рис. 1в,г), дополнительно содержащим октануклеотидный эффектор $pN_8(el)$. Так, для тандемного комплекса **5** ($PHK/BlmpN_8+pN_8(el)$) значение начальной скорости гидролиза РНК v_0 практически совпадает с v_0 для комплекса **1**, образованного с участием немодифицированного октануклеотида (PHK/pN_8). Аналогичные результаты получены и в случае додекануклеотидов: значение v_0 для комплекса **6** (рис. 1з) близко к значению v_0 для комплекса **3** (PHK/pN_{12}) (рис. 1з). Наблюдаемое увеличение начальной скорости гидролиза в тандемных комплексах **5** и **6** по сравнению с непрерывными комплексами **1** и **2**, по-видимому, связано с интенсивным гидролизом РНК в немодифицированной области комплекса $PHK/pN_8(el)$. Это предположение подтверждается составом продуктов гидролиза РНК. При гидролизе в комплексах **5** и **6** наряду с накоплением продуктов $p5-p11$ происходит интенсивное накопление продукта $p17$, образующегося при гидролизе фосфодиэфирной связи A17-U18. Этот же продукт наблюдается при гидролизе РНК в комплексе **7**, образованном РНК и эффектором $pN_8(el)$ (рис. 1в). Значения начальной скорости гидролиза РНК v_0 для комплексов **5** и **7** практически равны, а значение v_0 для комплекса **6** несколько выше, чем для комплекса **7**, по-видимому, за счет большей протяженности гибридного дуплекса.

Далее были исследованы субстратные свойства тандемного комплекса, ДНК-цепь которого состояла из блеомицинового производного короткого олигонуклеотида, фланкированного двумя октануклеотидными эффекторами. Известно, что в таких комплексах короткие олигонуклеотиды и их производные формируют стабильные комплексы с ДНК [25–27]. Из данных таблицы следует, что $BlmpN_4$ в составе тандемного комплекса **8** формирует достаточно стабильный дуп-

лекс и с РНК ($T_{пл}$ 36°C). Следует отметить, что комплекс **8** по протяженности, последовательностям и расположению остатка блеомицина идентичен комплексу **6** и отличается от него только наличием дополнительного одноцепочечного разрыва.

Первым существенным отличием гидролиза РНК в комплексе **8** по сравнению с комплексом **6** оказалось наличие дополнительного продукта $p14$, соответствующего гидролизу по фосфодиэфирной связи U14-U15. Таким образом, при гидролизе в комплексе **8** регистрируются все основные продукты ($p17, p14, p11, p8, p5$) (рис. 1д), наблюдавшиеся нами ранее [14] для этой же РНК в гибридных дуплексах с тандемом немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов (комплекс **9**) и с соответствующим ему нативным 20-мером (комплекс **10**). Оказалось, что начальная скорость гидролиза РНК в тандемном комплексе **8**, ДНК-цепь которого состояла из блеомицинового производного тетра- и двух октануклеотидных эффекторов, превышает значения v_0 не только для непрерывных комплексов **2** и **4**, образованных с участием более протяженных блеомициновых производных $BlmpN_8$ и $BlmpN_{12}$, но и для их тандемных комплексов **5** и **6**, ДНК-цепь которых состояла из эффектора $pN_8(el)$ и блеомицинового производного $BlmpN_8$ или $BlmpN_{12}$ соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что из всех исследованных гибридных комплексов, сформированных с участием блеомицинсодержащих олигонуклеотидов, гидролиз РНК эффективнее всего протекает в тандемном комплексе **8**.

Продукты $p17, p14, p11, p8, p5$, наблюдаемые при гидролизе в комплексах **8, 9** и **10**, регистрируются и при расщеплении РНК в гибридном комплексе **11**, образованном РНК и октануклеотидными эффекторами в отсутствие блеомицинового производного тетра- и двух октануклеотидов. Значения v_0 в комплексах **8** и **11** также оказались очень близки (рис. 1д). Более того, оказалось, что практически совпадают кинетические кривые гидролиза РНК в этих комплексах (включая кривые накопления 5'-меченых продуктов гидролиза по отдельным сайтам) (рис. 3а–е). Такое совпадение характера гидролиза могло бы указывать на простую идентичность комплексов **8** и **11**, а именно, на очень низкую степень ассоциации конъюгата $BlmpN_4$ в комплексе с РНК. Однако данные по термической денатурации соответствующего дуплекса свидетельствуют об обратном (см. таблицу), и при 20°C в присутствии эффекторов следует ожидать высокой степени ассоциации комплекса $PHK \cdot BlmpN_4$. Следовательно, характер гидролиза РНК рибонуклеазой Н в комплексах **8** и **9** может отличаться только за счет присутствия остатка блеомицина в комплексе **8**. Сходство процессов гидролиза РНК в комплексах **8, 9** и **11** – одинаковые продукты гидролиза и высокие значения v_0 – позволяет пред-

положить, что субстратные свойства данных гибридных дуплексов определяются в основном парой октануклеотидных эффекторов $pN_8(e1)$ и $pN_8(e2)$. Переход от комплекса **11** к комплексу **9** сопровождается улучшением субстратных свойств за счет роста протяженности гибридного дуплекса. В комплексе **8** это положительное влияние, по-видимому, компенсируется негативным эффектом остатка блеомицина, вследствие чего субстратные свойства комплексов **8** и **11** практически совпадают.

Таким образом, показано, что остаток блеомицина, введенный по 5'-концевой фосфатной группе олигодезоксирибонуклеотидов pN_8 и pN_{12} , снижает субстратные свойства формируемых непрерывных гибридных дуплексов. Это снижение может быть в значительной степени скомпенсировано использованием тандемных систем, где помимо блеомицинсодержащих олигонуклеотидов имеются эффекторы – немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды. Среди исследованных тандемных систем блеомициновое производное тетрауклеотида, фланкированное двумя эффекторами, формирует с РНК гибридный дуплекс с наилучшими субстратными свойствами, сравнимыми со свойствами гибридных дуплексов немодифицированного тандема и протяженного 20-звенного олигодезоксирибонуклеотида. Следовательно, блеомициновые производные олигодезоксирибонуклеотидов в тандемных системах удовлетворяют требованиям, предъявляемым к антисенс-олигонуклеотидам, поскольку образуют стабильный гибридный комплекс с РНК и стимулируют эффективный гидролиз РНКазой Н.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы полинуклеотидкиназа фага Т4 (Сибэнзим, Россия) и рибонуклеаза Н *E. coli* (Promega, США).

Эйкозарибонуклеотид UGCCUGGAGCUGCU-UGAUGC синтезирован твердофазным *H*-фосфонатным методом [28] и любезно предоставлен А.Г. Веньяминовой и М.Н. Репковой (Новосибирский институт биоорганической химии). Олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы по методу [29]. Блеомициновые производные олигонуклеотидов синтезированы по методу [30].

Концентрации олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически с использованием УФ-детектора жидкостного хроматографа “Милихром” (Россия). Коэффициенты молярного поглощения на длине волны 260 нм были рассчитаны по методу [31].

Термическую денатурацию олигонуклеотидных дуплексов исследовали в растворе, содержащем 0.05 М КСl, 0.01 М какодилат натрия (рН 7.4), 0.01 М MgCl₂, при концентрации каждого олигонуклеотидного компонента 1.3×10^{-5} М. Перед плавлением буферные растворы, содержащие комплементарные олигонуклеотиды в эквимольных количествах, нагревали до 80–90°C и медленно охлаждали до 4–5°C. Кривые оптического плавления регистрировали на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа “Милихром” (Россия) с одновременной детекцией на длинах волн 260, 270, 280, 300 и 320 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин. Кривые на-

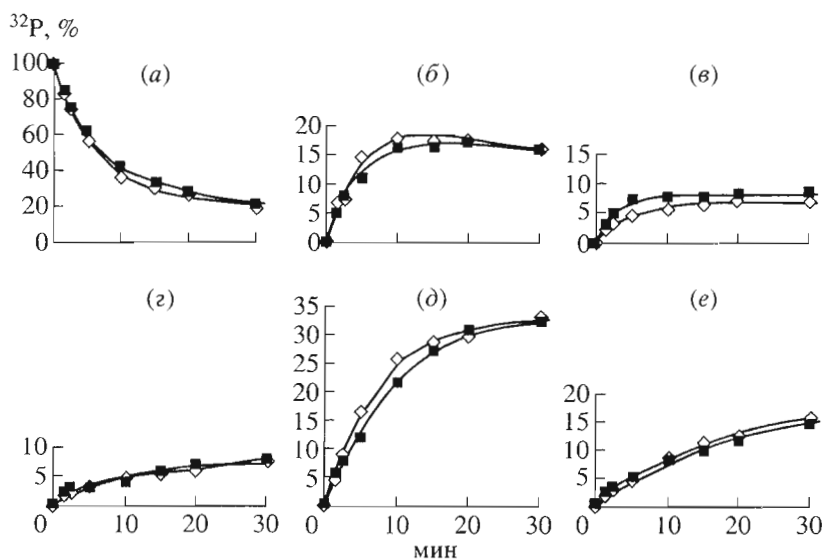


Рис. 3. Кинетические кривые гидролиза РНК рибонуклеазой Н (а) и накопления продуктов гидролиза в комплексах **8** (РНК/ $pN_8(e1)+BlmpN_4+pN_8(e2)$) и **11** (РНК/ $pN_8(e1)+pN_8(e2)$): $p17$ (б); $p14$ (в); $p11$ (г); $p8$ (д); $p5$ (е). Условия см. “Эксперимент. часть”.

гревания всех исследованных образцов совпадали с кривыми охлаждения.

Введение радиоактивной метки в РНК-мишень проводили с использованием полинуклеотидкиназы фага T4 (5 ед. акт.), 0.1 мКи [γ - 32 P]АТФ в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСI (рН 7.6), 10 мМ MgCl₂, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, 5 мМ дитиотреит (общий объем 15 мкл). Меченую РНК-мишень выделяли с использованием электрофореза в 20% ПААГ, элюировали из геля буферным раствором, содержащим 0.25 М ацетат аммония, 0.5 мМ EDTA, 0.1% додецилсульфат натрия, и осаждали этанолом.

Гидролиз рибонуклеазой *H. E. coli* проводили в растворе, содержащем 20 мМ HEPES (рН 8.0), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ дитиотреит. Концентрация РНК-мишени во всех экспериментах составляла 1×10^{-7} М, олигодезоксирибонуклеотидов – 2×10^{-6} М. Реакционные смеси (10 мкл) инкубировали при 20°C в течение 15 мин, затем добавляли 0.15 ед. акт. рибонуклеазы *H.* Через необходимое время добавляли 1 мкл раствора полиуридиловой кислоты (0.1 мг/мл) и осаждали олигонуклеотиды 2% раствором перхлората лития в ацетоне. Осадок растворяли и наносили на 20% ПААГ. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях (0.09 М Трис-Н₃ВО₃ (рН 8.3), 8 М мочевины, 40°C).

Начальную скорость гидролиза v_0 определяли по начальным участкам кинетических кривых (0–5 мин).

Гели радиоавтографировали на пленку CP-BU NIF 100 (AGFA, Бельгия). Интенсивность сигналов на радиоавтографах оценивали с помощью программного пакета Gel-Pro после предварительной калибровки по жидкостному сцинтилляционному счетчику Rackbeta (Wallac LKB, Финляндия) в воде по Черенкову. Относительная погрешность определения во всех опытах не превышала 20%. За степень расщепления принимали отношение интенсивности определяемой полосы к суммарной интенсивности всех полос в дорожке.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 99-04-49731) и Fogarty International Research Collaboration Award TW01094.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев П.Е., Пышина И.А., Пышный Д.В., Репкова М.Н., Веньяминова А.Г., Зенкова М.А., Иванова Е.М., Скалфи-Халп К., Зелигер Х., Бонора Ж.М., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 844–851.
2. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. // Tetrahedron Lett. 1967. V. 8. P. 3557–3562.
3. Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS / Ed. E. Wickstrom. N.Y.: Wiley-Liss, Inc., 1991.
4. Knorre D.G., Zarytova V.F., Badaikheeva A.G., Fedorova O.S. Реакционноспособные производные олигонуклеотидов как ген-направленные биологически активные вещества. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 37. Ред. Шабарова З.А. М.: ВИНТИ, 1991. С. 20–32.
5. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1994.
6. Lin S.B., Blake K.R., Miller P.S. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 1054–1061.
7. Chen C.B., Sigman D.S. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 6570–6572.
8. Frolova E., Fedorova O., Knorre D. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 5–12.
9. Sergeyev D.S., Zarytova V.F., Mamaev S.V., Godovikova T.S., Vlassov V.V. // Antisense Res. Dev. 1992. V. 2. P. 235–241.
10. Sergeyev D.S., Godovikova T.S., Zarytova V.F. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4400–4406.
11. Сергеев Д.С., Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 188–196.
12. Sergeyev D.S., Vorobjev P.E., Zarytova V.F. // Nucleosides Nucleotides. 1997. V. 16. P. 1575–1577.
13. Walder R.Y., Walder J.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 5011–5015.
14. Воробьев П.Е., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 728–734.
15. Williams A.P., Longfellow C.E., Freier S.M., Kierzek R., Turner D.H. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 4283–4291.
16. Chien M., Grollman A.P., Horwitz S.B. // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 3641–3647.
17. Bansal M., Stubbe J., Kozarich J.W. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 1846–1853.
18. Takita T., Muraoka Y., Fujii A., Itoh H., Maeda K., Umezawa H. // J. Antibiot. 1972. V. 25. P. 197–199.
19. Povirk L.F., Hogan M., Dattagupta N. // Biochemistry. 1979. V. 18. P. 96–101.
20. Fedoroff O.Yu., Salazar M., Reid B.R. // J. Mol. Biol. 1993. V. 233. P. 509–523.
21. Wilson W.D., Ratmeyer L., Zhao M., Strekowski L., Boykin D. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 4098–4104.
22. Shatz O., Mous J., LeGrice S.F.J. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 1171–1176.
23. Крынецкая Н.Ф., Сухомлинов В.В., Рейнтамм Т.Г., Метелев В.Г., Шабарова З.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1990. Т. 31. С. 305–309.
24. Сергеев Д.С., Денисов А.Ю., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 54–57.
25. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 102–104.
26. Kutayavin I.V., Podymingogin M.A., Bazhina Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Mamaev S.V., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1988. V. 238. P. 35–38.
27. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 895–900.

28. Веньямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.
29. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
30. Zarytova V.F., Sergeyev D.S., Godovikova T.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 189.
31. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids / Ed. G.D. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. V. 1. P. 589.

Cleavage of RNA in Hybrid Duplexes by *E. coli* Ribonuclease H. III. Substrate Properties of RNA Duplex Complexes with Oligodeoxyribonucleotides Containing a Bleomycin A₅ Residue

P. E. Vorobjev*, D. V. Pyshnyi*, E. Wickstrom**, and V. F. Zarytova**

#Phone: +7 (3832) 396-224; e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru

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

**Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA

The effect of the bleomycin A₅ residue linked to four-, eight-, and twelve-mer oligodeoxyribonucleotides on the substrate properties of their tandem and continuous (with or without unmodified octanucleotide effectors) hybrid duplexes was studied using *E. coli* RNase H. The bleomycin derivatives of oligodeoxyribonucleotides were shown to form hybrid duplexes with practically the same thermostability as those formed by unmodified oligodeoxyribonucleotides. The RNA in the bleomycin-containing hybrid duplexes is cleaved by the *E. coli* RNase H; however, the initial hydrolysis rate (v_0) is 2.6–3.4-fold reduced for the continuous duplexes. In the case of tandem hybrid complexes, the effect of bleomycin on v_0 was less pronounced. We hypothesized that steric factors play a key role in the bleomycin inhibition and effectors probably determine the substrate properties of such hybrid complexes. Of all the tandem systems studied, the RNA duplex with the bleomycin-containing tetranucleotide flanked with two effectors displayed the best substrate properties. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: bleomycin–oligodeoxyribonucleotide conjugates, ribonuclease H