

ВОРОБЬЕВ ПАВЕЛ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
КОНЪЮГАТАМИ БЛЕОМИЦИНА СОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ**

02.00.10 - биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук



Новосибирск, 2005 г.

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН (бывший Новосибирский институт биоорганической химии
СО РАИ)

Научный руководитель

кхн, профессор Зарыгова Валентина Филипповна

Официальные оппоненты

цхн Сильников Владимир Николаевич

кхн доцент Халимская Людмила Михайловна

Ведущая организация

Институт

цитологии

и генетики СО РАН

Защита состоится «29» апреля 2005 г в 10⁰⁰ часов
на заседании диссертционного совета Д 003 045 01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу 630090 Новосибирск-90, пр Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «28» марта 2005 г

Ученый секретарь диссертационного совета

д х н



Федорова О.С

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Направленная модификация нуклеиновых кислот при помощи реакционноспособных производных олигонуклеотидов (РПО) является одним из основных подходов к решению целого ряда задач современной физико-химической биологии. В их числе – исследование нуклеиново-белковых взаимодействий, манипулирование генетическим материалом, регуляция экспрессии гена, генная конверсия. В качестве реакционноспособных групп при создании РПО перспективно использовать соединения, способные к многократной реактивации и многократному взаимодействию с субстратом. К числу таких группировок принадлежит остаток гликопептидного антибиотика блеомицина, обладающий рядом уникальных свойств. Наиболее важными из них являются

- способность вызывать прямое (наблюдаемое без дополнительных обработок) расщепление ДНК и РНК,
- высокая селективность окисления дезоксирибозы и рибозы (гетероциклические основания практически не модифицируются),
- относительно низкая токсичность, позволяющая применять антибиотик как противоопухолевое средство в терапевтической практике.

В ЛХНК НИБХ СО РАН впервые были созданы блеомициновые производные олигонуклеотидов. Был разработан способ конъюгирования блеомицина А5 и олигонуклеотидов с сохранением способности олигонуклеотидов образовывать комплементарные комплексы, а остатка блеомицина – осуществлять селективное расщепление ДНК. Первые исследования показали, что конъюгаты блеомицина с олигонуклеотидами обладают рядом уникальных свойств. Они могут эффективно расщеплять одноцепочечные ДНК в составе комплементарных дуплексов. В зависимости от условий одна молекула конъюгата может повреждать до трех молекул ДНК или наносить несколько повреждений одной молекуле мишени. Кроме того, было выявлено, что остаток блеомицина в составе олиготимидилата способен осуществлять прямые разрывы двуцепочечных ДНК в триплексах. До сих пор неизвестны другие конъюгаты олигонуклеотидов, обладающие столь уникальными свойствами. Полученные результаты безусловно свидетельствовали о том, что конъюгаты блеомицина с олигонуклеотидами являются одними из наиболее перспективных реакционноспособных производных олигонуклеотидов.

Целью данной работы являлось исследование расщепления одноцепочечных ДНК конъюгатами блеомицина с олигонуклеотидами в составе тандемных комплексов с эффекторами, исследование возможности повышения эффективности расщепления двуцепочечных ДНК конъюгатами блеомицина с триплекс-формирующими олигонуклеотидами в составе триплексов, исследование взаимодействия блеомицин-олигонуклеотидных конъюгатов с РНК, а также исследование влияния остатка блеомицина в составе олигодезоксирибонуклеотидов на способность РНКазы *H. E. coli* расщеплять РНК в составе гибридных дуплексов, образованных с их участием.

Научная новизна и практическая ценность. В настоящей работе впервые исследовано расщепление фрагментов ДНК конъюгатами блеомицина с олигонуклеотидами в тандемных комплексах с олигонуклеотидными эффекторами. Показано, что в тандемных комплексах одна молекула конъюгата блеомицина с тетрауклеотидом может расщепить свыше 6 молекул ДНК-мишени. Обнаружено,

что максимальную эффективность проявляют конъюгаты с коротким олигонуклеотидным адресом (4-5 нуклеотидов), повреждающие мишень в сайте связывания конъюгата

Впервые показана возможность расщепления РНК (30-звенного фрагмента) конъюгатами блеомицина с олигодезоксирибонуклеотидами

Разработан метод синтеза новых конъюгатов блеомицина с олигонуклеотидами, содержащих линкеры на основе гексаэтиленгликольфосфата. Показано, что такие конъюгаты более эффективно расщепляют двуцепочечные ДНК в составе триплексов. Также показано, что использование линкер-содержащих конъюгатов позволяет существенно повысить эффективность направленного расщепления РНК за счет формирования в цепи РНК однонуклеотидных петель, являющихся сайтами предпочтительного связывания остатка блеомицина, и его доставки к таким сайтам при помощи линкера оптимальной длины.

Выявлено, что субстратные свойства блеомициновых производных коротких олигонуклеотидов в составе тандемных гибридных дуплексов по отношению к рибонуклеазе *H. E. coli* близки к таковым для протяженных олигонуклеотидов.

Конъюгаты блеомицина с олигонуклеотидами могут найти применение в антисенс- и антигенном подходах к регуляции экспрессии гена, для генной конверсии, а также могут быть использованы в молекулярно-биологических исследованиях в качестве эффективных искусственных нуклеаз с уникальной специфичностью. Низкая токсичность блеомицина позволяет также надеяться на возможность использования его конъюгатов с олигонуклеотидами в качестве терапевтических средств.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ. Результаты работы были представлены на III съезде Биохимического общества, Санкт-Петербург, 2002 г. и международных конференциях «RNA as Therapeutic and Genomic Target», Новосибирск, Россия, 2001 г., XV International Round Table «Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids», 2002, Leuven, Belgium, «Targeting RNA Artificial Ribonucleases, Conformational Traps and RNA Interference», Новосибирск, Россия, 2003 г., «RNase H 2004», 2004, Strasbourg, France.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 104 страницах, содержит 49 рисунков и 5 таблиц. Библиография включает 133 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез блеомициновых производных олигонуклеотидов

Для выполнения данной работы были синтезированы конъюгаты двух типов (Рис. 1). В конъюгатах первого типа (Рис. 1 а) остаток блеомицина непосредственно связан с концевой фосфатной группой олигонуклеотида. Далее такие конъюгаты будут обозначаться как «стандартные». Конъюгаты второго типа (Рис. 1 б) содержат между остатками олигонуклеотида и блеомицина линкеры, состоящие из нескольких остатков гексаэтиленгликольфосфата. Такие конъюгаты (далее - линкерсодержащие) синтезированы и охарактеризованы впервые. Гибкие протяженные линкеры были введены в состав конъюгатов с целью обеспечить остатку блеомицина высокую конформационную под-

дипиридилдисульфида (Py_2S_2) и трифенилфосфина (Ph_3P) в присутствии 4- N,N -диметиламинопиридин-1-оксида (DMAPO). Образующееся активное производное вводили в реакцию с медьсодержащим комплексом блеомицина

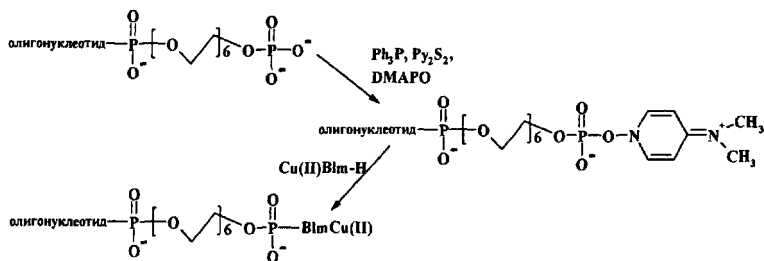


Рис. 2. Схема синтеза линкерсодержащих конъюгатов.

Последовательности синтезированных конъюгатов приведены в таблице 2

Таблица 2. Линкерсодержащие конъюгаты.

Структура конъюгата	Условное обозначение
$\text{BlmpLpTTTTTTTTTTTTTTTT}$	BlmpLpT_{16}
$\text{TTTTTTTTTTTTTTTTTpLpBlm}$	$\text{T}_{16}\text{pLpBlm}$
$\text{ATTGTTTTCCTCCG(pL)}_2\text{pBlm}$	$\text{N}_{16}(\text{pL})_2\text{pBlm}$
$\text{ATTGTTTTCCTCCG(pL)}_3\text{pBlm}$	$\text{N}_{16}(\text{pL})_3\text{pBlm}$
$\text{ATTGTTTTCCTCCG(pL)}_4\text{pBlm}$	$\text{N}_{16}(\text{pL})_4\text{pBlm}$

Очистка и идентификация целевых конъюгатов была выполнена методами ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии. По данным электрофореза в денатурирующем ПААГ все конъюгаты гомогенны. Структура конъюгатов $\text{N}_{16}(\text{pL})_2\text{pBlm}$, $\text{N}_{16}(\text{pL})_3\text{pBlm}$ и $\text{N}_{16}(\text{pL})_4\text{pBlm}$ была подтверждена при помощи MALDI масс-спектрометрии.

2. Расщепление одноцепочечных ДНК конъюгатами блеомицина с олигонуклеотидами

Ранее было показано, что одна молекула стандартного конъюгата блеомицина с олигонуклеотидом способна повредить около трех молекул ДНК-мишени. Однако, согласно литературным данным, одна молекула антибиотика способна повредить до 10 молекул ДНК-мишени. Поскольку эффективность действия является одной из важнейших характеристик реакционноспособных производных олигонуклеотидов, исследование возможности ее повышения представляет значительный интерес.

2.1. Расщепление одноцепочечных ДНК конъюгатами блеомицина с протяженной олигонуклеотидной частью

Ранее было показано, что одним из факторов, определяющих эффективность действия РПО на нуклеиновые кислоты, является стабильность комплементарного комплекса РПО-мишень. Повысить

стабильность такого комплекса возможно за счет увеличения длины олигонуклеотидного адреса. Мы исследовали расщепление одноцепочечной ДНК-мишени **D30** конъюгатом блеомицина с 15-звенным олигонуклеотидом **BlmpN₁₅** (Рис 3). Здесь и далее исследовали расщепление меченой мишени

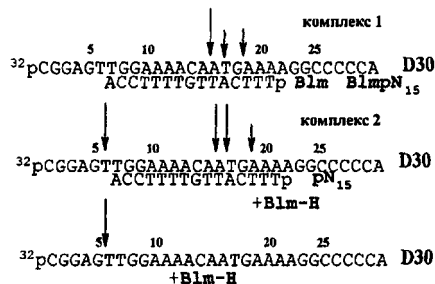


Рис. 3. Комплементарные комплексы, образуемые ДНК-мишенью **D30**, с олигонуклеотидом **N₁₅** и его блеомициновым конъюгатом

повреждаемые нуклеотидные остатки. Расщепление мишени **D30** в составе комплекса 1 протекает по нуклеотидным остаткам А16, Т17, А19 (Рис 4, дорожка 3 и рис 3, комплекс 1). Неконъюгированный блеомицин расщепляет **D30** преимущественно по нуклеотидному остатку Т6 (рис 4, дорожка 2), в GT-последовательности, являющейся предпочтительной для расщепления свободным блеомицином



Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов расщепления ³²P-меченой мишени **D30** конъюгатом **BlmpN₁₅** и неконъюгированным блеомицином. Все реакционные смеси содержали $1 \cdot 10^{-4}$ М **D30**, 0,2 М **LiCl**, 0,01 М трис-**HCl** рН 7,5. 1 - мишень **D30** в условиях реакции без добавления конъюгата или блеомицина, 2 - $1 \cdot 10^{-4}$ М неконъюгированного блеомицина, 3 - $1 \cdot 10^{-6}$ М конъюгата **BlmpN₁₅**, 4 - $1 \cdot 10^{-4}$ М неконъюгированного блеомицина и $1 \cdot 10^{-6}$ М олигонуклеотида **N₁₅**. Реакции инициировали одновременным добавлением 0,05 М 2-меркаптоэтанола и $1 \cdot 10^{-4}$ М **Fe(NH₄)₂(SO₄)₂**. Пробы инкубировали при 20 °С в течение 4 ч.

Обнаруженные различия в позиционной направленности расщепления мишени **D30** конъюгатом **BlmpN₁₅** и неконъюгированным блеомицином позволяют заключить, что расщепление мишени конъюгатом **BlmpN₁₅** является специфическим, то есть протекает только в составе комплементарного комплекса конъюгат мишень

Известно, что при расщеплении ДНК как блеомицином, так и его олигонуклеотидными конъюгатами прямые разрывы цепи и щелочелабильные сайты образуются в приблизительно равном соотношении. В данной работе эффективность повреждения ДНК-мишени конъюгатами оценивалась по суммарной степени модификации, наблюдаемой после обработки ДНК-мишени 0,1 М раствором 1-бутиламина в течение 8 мин для выявления щелочелабильных сайтов. За степень расщепления принимали отношение радиоактивности пятен, соответствующих продуктам расщепления, к суммарной радиоактивности дорожки геля. Предельная степень расщепления мишени **D30** конъюгатом **BlmpN₁₅** зависит от соотношения концентраций конъюгата и мишени. При соотношении 1:1 при

Продукты расщепления анализировали методом электрофореза в денатурирующем ПААГ. Повреждаемые нуклеотидные остатки идентифицировали по статистическому расщеплению ³²P-меченых мишеней по методу Максама - Гилберта. Соответствующие дорожки на радиоавтографах обозначены «А+Г» для пуриновых нуклеотидов и «Т+С» для пиримидиновых.

На рис 3 и далее стрелками обозначены

20 °С предельная степень расщепления достигается за 4 часа и составляет 40%, а при 10-кратном избытке конъюгата достигает 55%. Принимая во внимание способность блеомицина к реактивации и повторной модификации ДНК-мишени, мы исследовали расщепление мишени в условиях 10-кратного недостатка конъюгата. Предельная степень расщепления мишени **D30** в таких условиях составляет 11%, что соответствует расщеплению в среднем 11 молекул **D30** одной молекулой конъюгата.

Таким образом, возможность повреждения нескольких молекул ДНК-мишени одной молекулой конъюгата с длинным олигонуклеотидным адресом практически не реализуется.

2.2. Расщепление ДНК конъюгатами блеомицина с короткими олигонуклеотидами в присутствии олигонуклеотидных эффекторов

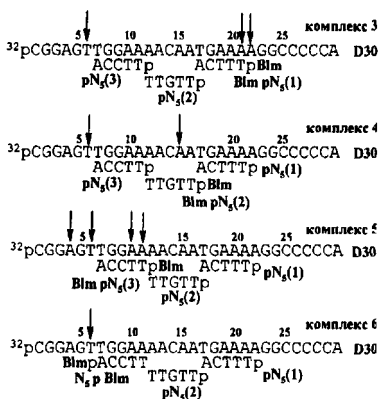
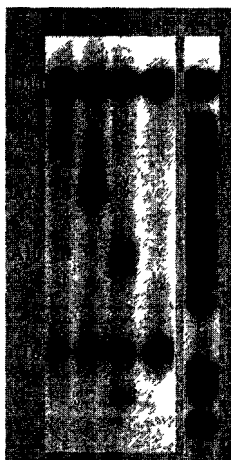


Рис. 5. Структура тандемных комплексов 3-6.



Мишень **D30** расщепляется конъюгатами **BlmpN₅(1)**, **BlmpN₅(2)**, **BlmpN₅(3)** и **N₅pBlm** в составе комплексов 3-5 как по нуклеотидным остаткам, расположенным в непосредственной близости от остатка блеомицина в составе комплекса (повреждаемые нуклеотидные остатки помечены на рис. 5 стрелками), так и по нуклеотидному остатку **T6**.

Рис. 6. Электрофоретический анализ продуктов расщепления ³²P-меченой мишени **D30** конъюгатами блеомицина с короткими олигонуклеотидами в комплексах 3-6. Все реакционные смеси содержали 1·10⁻⁵ М **D30**, 0.2 М **LiCl**, 0.01 М **трис-HCl** pH 7.5. 1 - **BlmpN₅(1)**, эффекторы **pN₅(2)** и **pN₅(3)** (комплекс 3), 2 - **BlmpN₅(2)**, эффекторы **pN₅(1)** и **pN₅(3)** (комплекс 4), 3 - **BlmpN₅(3)** к т о р ы **pN₅(1)** и **pN₅(2)** (комплекс 5), 4 - **N₅pBlm**, эффекторы **pN₅(1)** и **pN₅(2)** (комплекс 6). Концентрация конъюгатов и эффекторов - 1·10⁻⁶ М. Пробы инкубировали при 20°С в течение 18 ч.

В комплексе 6, в котором остаток блеомцина располагается вблизи сайта T6, расщепляется только этот нуклеотидный остаток (Рис 5,6)

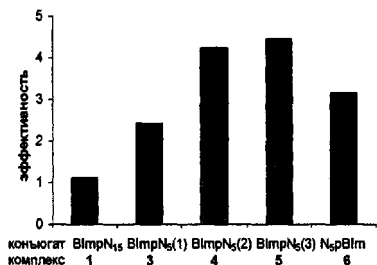


Рис 7. Эффективность расщепления D30 конъюгатами блеомцина с олигонуклеотидами в комплексах 1, 3-6 в условиях 10-кратного избытка мишени D30.

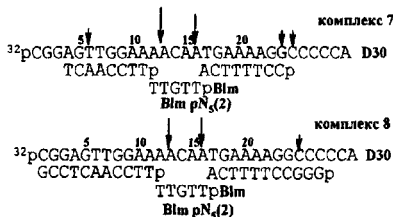


Рис 8. Структура тандемных комплексов 7,8.

Предельная степень расщепления ДНК-мишени в комплексах 3, 4, 5 и 6 (при 10-кратном избытке мишени D30) составляет 24 - 44% Это соответствует расщеплению в среднем 2,4 - 4,4 молекул мишени одной молекулой конъюгата. Далее эту величину - среднее число молекул ДНК-мишени, поврежденных одной молекулой конъюгата, - принимали за эффективность конъюгатов в условиях избытка ДНК-мишени (Рис 7)

Таким образом, переход от непрерывного 15-звенного олигонуклеотидного адреса к равному по протяженности трехкомпонентному тандему приводит к более чем четырехкратному увеличению эффективности расщепления, но при этом существенно снижает его специфичность. По-видимому, в данном случае низкая специфичность расщепления мишени вызвана недостаточной стабильностью комплементарного комплекса ДНК-ми-

шеней конъюгат

Мы попытались повысить стабильность комплекса конъюгат мишень, улучшив комплексообразующие свойства эффекторов. Было исследовано расщепление мишени D30 конъюгатом BImpN5(2), фланкированным парой 8- (комплекс 7) или 11-звенных (комплекс 8) эффекторов (Рис. 8). Специфичность расщепления мишени D30 в комплексах 7 и 8 (Рис 8, 9) значительно выше, чем в комплексах 3 - 5. Нуклеотидный остаток T6 практически не повреждается

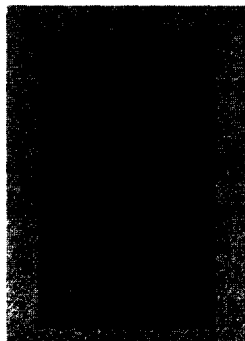


Рис 9. Электрофоретический анализ продуктов расщепления ³²P-меченой мишени D30 конъюгатами BImpN5(2) (комплекс 7, дорожка 1 и комплекс 8, дорожка 2), BImpN5(1) (комплекс 9, дорожка 3), BImpN5(4) (комплекс 10, дорожка 4) и BImpN6 (комплекс 11, дорожка 5). Концентрация D30 1·10⁻⁵, концентрация конъюгатов и эффекторов - 1·10⁻⁶ в буферном растворе: 0,2 M LiCl, 0,01 M трис-НСl (pH 7,5). Пробы инкубировали при 20°C в течение 18 ч.

Увеличение длины эффекторов практически не влияет на эффективность расщепления мишени D30 в комплексах 7 и 8 эта величина составляет 4 и 3 соответственно. Таким образом, увеличение

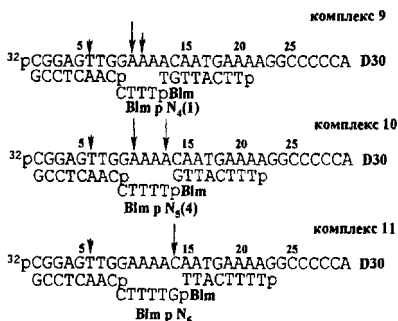


Рис. 10. Структура tandemных комплексов 9-11.

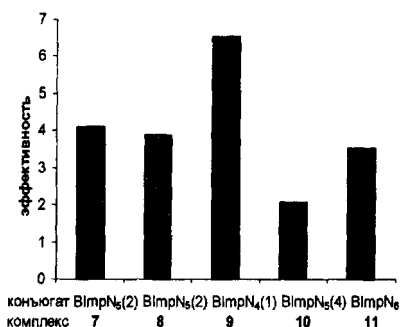


Рис. 11. Эффективность расщепления D30 конъюгатами блеомицина с олигонуклеотидами в комплексах 7-11 в условиях 10-кратного избытка мишени D30.

длины эффекторов от 5 до 8 нуклеотидов (комплекс 7) позволяет существенно повысить специфичность расщепления ДНК-мишени. Дальнейшее увеличение длины эффекторов до 11 нуклеотидов (комплекс 8) не оказывает заметного влияния на процесс расщепления (Рис 9, И)

Также было исследовано расщепление мишени D30 в tandemных комплексах 9-11 (Рис 10) конъюгатами блеомицина с четырех- (BImрN₄(1)), пяти- (BImрN₅(4)) и шестизвеньевыми (BImрN₆) олигонуклеотидами в присутствии 8-звенных эффекторов. В таких tandemных комплексах расщепление протекает с высокой специфичностью: сайт Т6 является минорным (Рис 9). Максимальная эффективность расщепления мишени D30 - 65 (Рис 9, И) наблюдается при использовании конъюгата BImрN₄(1) (комплекс 9).

Таким образом, эффективность расщепления ДНК блеомициновыми производными коротких олигонуклеотидов в tandemах с эффек-

Т⁰ P^{ами} существенно превышает эффективность ее расщепления конъюгатами блеомицина с

протяженными олигонуклеотидами. По-видимому, эффективность и специфичность действия таких tandemов зависит от длины олигонуклеотидной части конъюгата и от длины эффекторов. Среди исследованных конъюгатов наиболее эффективны блеомициновые производные тетра- или пентануклеотидов, фланкированные октануклеотидными эффекторами. Но, очевидно, существуют другие факторы, определяющие эффективность действия таких конъюгатов в tandemных комплексах. Так, конъюгаты BImрN₅(2) и BImрN₅(4), в присутствии восьмизвенных эффекторов расщепляют мишень D30 с различной эффективностью - 4.1 и 2.1 соответственно.

2.2.1. Факторы, определяющие эффективность расщепления одноцепочечных ДНК конъюгатами блеомицина с короткими олигонуклеотидами в составе tandemных комплексов

Мы попытались выявить факторы, определяющие эффективность окислительного расщепления ДНК конъюгатами блеомицина с олигонуклеотидами. Исследование было выполнено в рамках модельной системы, представленной на рис 12 и включающей в себя мишень D20, конъюгаты BImрN₄,

BlmpN₈, BlmpN₁₂, эффекторы PhnpN₈(1)Phn и PhnpN₈(2)Phn (эффекторы любезно предоставлены И. А. Пышной (ИХБФМ СО РАН))

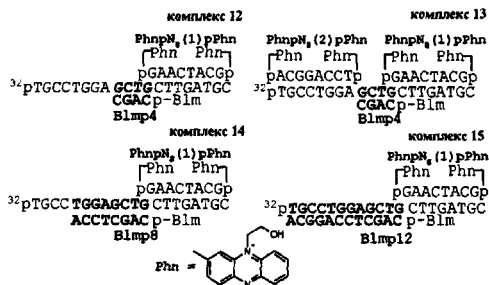


Рис. 12. Структура tandemных комплексов 12-15.

Исследование каталитической эффективности конъюгатов проводили при соотношении концентраций конъюгата и мишени 110. Все конъюгаты расщепляют мишень D20 специфично по сайтам СЮ и А8 (Рис. 13). Во всех случаях преобладает расщепление по сайту С10, в комплексе 13 более 90% от суммарной степени расщепления приходится этот сайт. Таким образом, расщепление осуществляется высокоселективно. Неконъюгированный блеомицин расщепляет мишень D20 преимущественно по сайтам СЮ и С3, причем оба сайта повреждаются в равной степени. Максимальная эффективность повреждения ДНК-мишени неконъюгированным и немодифицированным тетра nukлеотидом - 6.4.



Рис. 13. Результаты электрофоретического разделения в 20% ПААГ продуктов деградации ³²P-меченой мишени D20 блеомицином и его олигонуклеотидными конъюгатами. Все реакционные смеси содержали: 2*10⁻⁵ M D20, 0.2 M LiCl, 0.01 M трис-HCl pH 7.5. 2 - D20 в отсутствие конъюгатов и эффекторов, 3 - BlmpN₈ + PhnpN₈(1)Phn, 4 - BlmpN₈ + PhnpN₈(1)Phn + PhnpN₈(2)Phn, 5 - BlmpN₈ + PhnpN₈(1)Phn, 6 - BlmpN₁₂ + PhnpN₈(1)Phn, 7 - неконъюгированный блеомицин в присутствии тетра nukлеотидов pCAGC и эффекторов PhnpN₈(1)Phn и PhnpN₈(2)Phn. Дорожки 1 и 8 - A+G и T+C соответственно. Концентрации конъюгатов и свободного блеомицина 2*10⁻⁶ M, концентрация эффекторов 10⁻⁵ M. Реакционные смеси инкубировали 16 ч при 20 °C.

Конъюгат **BlmpN₁₂** в комплексе 15 при 20 °C демонстрирует наименьшую среди всех конъюгатов эффективность - 1.0 (Рис. 14 а, кривая 1). Повышение температуры реакции до 45 °C приводит к возрастанию эффективности до 2.1. Аналогичную зависимость эффективности от температуры демонстрирует конъюгат **BlmpN₈**: при увеличении температуры от 20 до 45 °C происходит повышение эффективности от 1.2 до 3.5 (Рисунок 14 а, кривая 2).

В случае конъюгата **BlmpN₈** наблюдается противоположная зависимость. Этот конъюгат демонстрирует максимальную эффективность - 6.4 - при 20 °C (Рис. 14 б, кривая 1). Близкая зависимость эффективности расщепления от температуры наблюдается для неконъюгированного блеомицина в присутствии эффектора **PhnpN₈(1)Phn** и тетра nukлеотидов pCAGC (Рис. 14 б, кривая 2). В присутствии дополнительного октануклеотидного эффектора **PhnpN₈(2)Phn**, связывающегося с ми-

шению D20 в 5'-концевой области, высокая эффективность конъюгата **BlmpN₄** (6 5) сохраняется в интервале 20-35 °С и лишь при более высоких значениях температуры снижается до 2 4 (Рис 14 б, кривая 3)

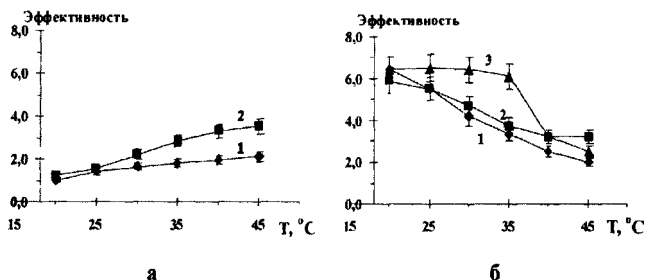


Рис 14. Зависимость эффективности расщепления мишени D20 от температуры: а: 1 - конъюгат **BlmpN₁₂** в присутствии эффектора **PhnpN₈(1)Phn** (комплекс 14), 2 - конъюгат **BlmpN₈** в присутствии эффектора **PhnpN₈(1)Phn** (комплекс 14). б: 1 - конъюгат **BlmpN₄** в присутствии эффектора **PhnpN₈(1)Phn** (комплекс 12)), 2 - неконоjugированный блеомицин в присутствии эффектора **PhnpN₈(1)Phn** и тетрауклеотида pCAGC, 3 - конъюгат **BlmpN₄** в присутствии эффекторов **PhnpN₈(1)Phn** и **PhnpN₄(1)Phn** (комплекс 13). Условия реакции см. в подписи к рис 13.

Таким образом, наблюдаются две противоположных зависимости эффективности расщепления от температуры реакции. Эффективность длинных конъюгатов (**BlmpN₈**, **BlmpN₁₂**) увеличивается с повышением температуры, тогда как эффективность конъюгата **BlmpN₄** с ростом температуры снижается.

Возможной причиной ограничения активности конъюгатов могло бы быть расщепление олигонуклеотидной части конъюгата его собственным остатком блеомицина. Было исследовано расщепление мишени D20 ³²P-мечеными конъюгатами в присутствии эффекторов. Выяснилось, что олигонуклеотидная часть конъюгата **BlmpN₄** в процессе реакции расщепляется незначительно (<10%). Конъюгаты **BlmpN₈** и **BlmpN₁₂** расщепляются на 18-21%. Таким образом, саморасщепление конъюгатов не может существенно снижать их эффективность. Кроме того, предельная степень саморасщепления конъюгатов не зависит от температуры реакции, и практически одинакова при 25 и 45 °С.

Была исследована стабильность комплементарных комплексов (выделенные участки в комплексах 12-15 на рис 12), образуемых конъюгатами с ДНК в присутствии эффекторов. Из данных термической денатурации (таблица 3) следует, что степень ассоциации комплексов, образуемых

Таблица 3. Температура плавления¹ комплексов, образованных конъюгатами с исходной мишенью D20, и структурными аналогами продуктов ее окислительного расщепления

Конъюгат	D20		N ₉ -N ₁₀		N ₉	
	комплекс	T _{пл} , °C	комплекс	T _{пл} , °C	комплекс	T _{пл} , °C
BlmpN₄	12	31	12a'	-	126'	-
BlmpN₄	13	45	13a'	<5	136'	-
BlmpN₈	14	57	14a'	33	146'	15
BlmpN₁₂	15	66	15a'	57	156'	52

Данные по термической денатурации любезно предоставлены Д. В. Пышным (ИХБФМ СО РАН)

конъюгатом **B1mpN₉** с мишенью **D20**, приближается к 1 лишь в узком интервале температур 20-25 °С в составе комплекса 12 и 20-35 °С в комплексе 13

Как видно на рис 14, в этих температурных интервалах достигается максимальная эффективность расщепления мишени **D20** в комплексах 12 и 13 По-видимому, снижение эффективности конъюгата **B1mpN₉** за пределами этих температурных интервалов вызвано снижением степени ассоциации комплекса конъюгат мишень Степень ассоциации исходных комплексов конъюгатов **B1mpN₉** и **B1mpN₁₂** по данным термической денатурации близка к 1 во всем исследованном интервале температур

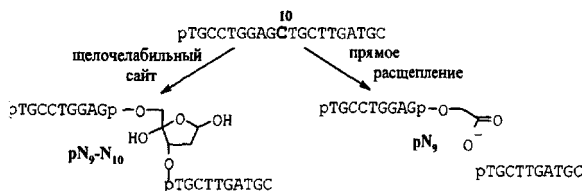


Рис. 15. Продукты окисления мишени D20 при повреждении нуклеотидного остатка СЮ блеомицином.

Известно, что при прямом расщеплении ДНК блеомицином образуются укороченные фрагменты, один из которых (5'-концевой) содержит на 3'-конце в точке разрыва фосфогликолят, а другой - 5'-фосфат При образовании щелчабильного сайта полноразмерный олигонуклеотид сохраняется,

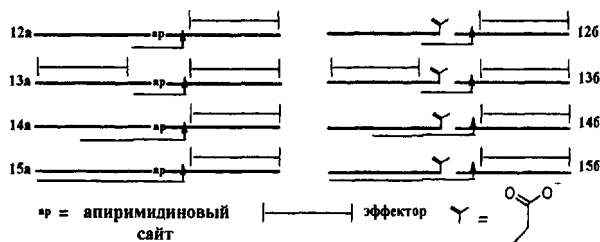


Рис. 16. Схематическое изображение комплексов 12а-15а и 126-156.

Согласно этой схеме, рассматриваемые исходные комплексы 12,13,14 и 15 вследствие окисления остатком блеомицина и последующих превращений окисленного остатка дезоксирибозы переходят в комплексы 12а, 13а, 14а и 15а и в комплексы 126, 136, 146 и 156 (Рис 16) Для оценки стабильности комплексов серии «а» был синтезирован стабильный аналог продукта **pN₉-N₁₀** - олигонуклеотид **pN₉-N₁₀**¹ держащий в

комплеск 13а'

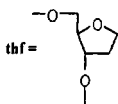
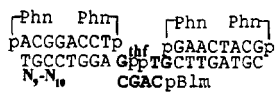


Рис. 17. Структура комплекса На.

положении 10 вместо гидроксированного остатка дезоксирибозы его структурный аналог (thf на рис 17)

Комплеск 13а' не регистрируется по данным термической денатурации в интервале температур выше 5°С Это позволило исклю-

¹ Синтезирован Д В Пышным (ИХБФМ СО РАН)

чить из рассмотрения, как еще менее стабильные, комплексы 12а, 12б и 13б, а в случае комплексов 14б и 15б - исследовать лишь термическую денатурацию комплексов конъюгатов **BimpN₄** и **BimpN₁₂** с нонануклеотидным фрагментом **N₉** (Рис 18, табл 3)

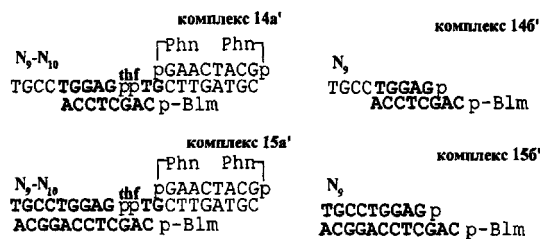


Рис. 18. Структура комплексов 14а', 14б', 15а' и 15б'.

Из данных таблицы 3, следует, что основное различие между конъюгатом **BimpN₄** и более длинными, заключается в стабильности комплементарных комплексов, образуемых ими с продуктами окислительного расщепления ДНК-мишени

Очевидно, что продукты окисле-

ния **D20** – **pN₉-N₁₀** и **pN₉** - не могут выступать в роли конкурентных ингибиторов, связывающих конъюгат **BimpN₄** в непродуктивных комплексах. Напротив, высокая стабильность комплексов, образуемых **BimpN₈** и **BimpN₁₂** с продуктами деградации **D20** приводит к конкурентному ингибированию процесса расщепления. По данным термической денатурации ингибирование должно быть менее выражено в случае конъюгата **BimpN₈**. На рис 14 а видно, что это в действительности имеет место - конъюгат **BimpN₈** активнее, чем конъюгат **BimpN₁₂** практически во всем исследованном интервале температур

Известно, что в отсутствие субстратов происходит быстрая самоинактивация остатка блеомицина. В нашем случае такая инактивация может протекать в составе долгоживущих ингибиторных комплексов, образованных конъюгатами блеомицина с поврежденной мишенью **D20**. Именно самоинактивация остатка блеомицина делает наличие таких комплексов фактором, ограничивающим эффективность конъюгатов

Полученные результаты позволяют заключить, что скорость диссоциации комплекса конъюгат-продукт, образующегося в результате расщепления ДНК, играет определяющую роль в каталитическом расщеплении нуклеиновых кислот реакционноспособными производными олигонуклеотидов, изначально образующими с целевой мишенью стабильный комплекс. Максимальная эффективность таких конъюгатов может быть достигнута лишь при соблюдении двух основных требований: полная ассоциация исходного комплекса конъюгат-мишень и быстрая диссоциация образующегося комплекса конъюгат-продукт. Максимальная эффективность расщепления ДНК (более шести молекул ДНК-мишени в расчете на одну молекулу конъюгата) наблюдается для тетрануклеотидного конъюгата блеомицина, фланкированного двумя октануклеотидными эффекторами. Такие конъюгаты в тандемных комплексах идеально удовлетворяют двум основным требованиям, предъявляемым к каталитическим реагентам: высокая стабильность исходного комплекса с целевой ДНК и быстрая диссоциация реагента из комплекса с продуктами реакции. Высокая стабильность исходного комплекса обеспечивается олигонуклеотидными эффекторами, а высокая скорость диссоциации - повреждением ДНК непосредственно в сайте связывания.

Выявление факторов, определяющих высокую эффективность расщепления ДНК блеомициновыми производными олигонуклеотидов, открывает путь к рациональному дизайну каталитических

реагентов, а на их основе - искусственных нуклеаз, которые могут иметь большое значение для развития генной терапии

3. Субстратные свойства tandemных гибридных дуплексов, содержащих конъюгаты блеомицина с короткими олигонуклеотидами, по отношению к рибонуклеазе *H. E. Coli*

Взаимодействие антисмысловых олигонуклеотидов с целевыми матричными РНК может приводить как к гибридизационному аресту трансляции данных мРНК, так и к их гидролизу РНКазой Н в составе образующихся гибридных дуплексов. Поскольку эффективность антисмысловых олиго-

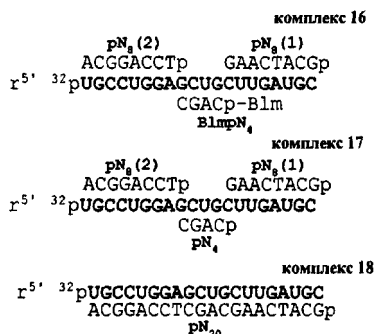


Рис. 19. Структура гибридных комплексов

нуклеотидов и их производных может быть напрямую связана со способностью образуемых ими гибридных дуплексов вызывать гидролиз матричных РНК РНКазой Н, важно иметь данные о возможности исследуемых систем формировать субстраты для РНКазы Н. Ранее гидролиз РНК РНКазой Н в составе гибридных дуплексов с tandemными наборами коротких олигонуклеотидов исследован не был.

Исследование влияния блеомицина, ковалентно присоединенного к 5'-фосфатной группе олигодезоксирибонуклеотидов было проведено в условиях

полного связывания матрицы **R20** исследуемыми соединениями (Рис 19, таблица 4), поскольку в

этом случае различия в начальных скоростях гидролиза РНК (V_0) отражают различия в субстратных свойствах гибридных дуплексов. Как видно из таблицы 4, значения температур плавления непрерывных и tandemных комплементарных комплексов достаточно высоки. Это свидетельствует о том, что степень ассоциации таких комплексов при 20°C должна быть близка к 1, даже с учетом перехода к более низким концентрациям. Поэтому влияние остатка блеомицина на субстратные свойства гибридных дуплексов оценивали по начальной скорости гидролиза рибонуклеазой Н 20-звенной матрицы **R20** при 20°C, то есть в условиях ее полного связывания исследуемыми производными.

Таблица 4. Температура плавления¹ гибридных комплексов «**R20** + tandem»

Комплекс	tандем	T _{пл} , °C
16	pN ₈ (1)+BlmpN ₄ +pN ₈ (2)	36 ¹ , 53 ² , 40 ³
17	pN ₈ (1)+pN ₄ +pN ₈ (2)	39 ¹ , 53 ² , 40 ³

¹ - T_{пл} комплекса BlmpN₄ с мишенью **R20** в присутствии эффекторов pN₈(1) и pN₈(2)

² - T_{пл} комплекса эффектора pN₈(1) с мишенью **R20**

³ - T_{пл} комплекса эффектора pN₈(2) с мишенью **R20**

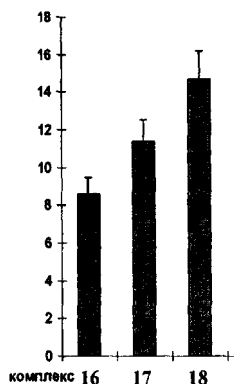
⁴ - T_{пл} комплекса pN₄ с мишенью **R20** в присутствии эффекторов pN₈(1) и pN₈(2)

¹ Данные любезно предоставлены Д. В. Пышным (ИХБФМ СО РАН)

Начальная скорость гидролиза (V_0) **R20** РНКазой *H. E. coli* в гибридных дуплексах с конъюгатами BlmpN₈ и BlmpN₁₂ в 3-4 раза ниже, чем скорость гидролиза в гибридных дуплексах с исходными

олигодезоксирибонуклеотидами pN_8 и pN_{12} (данные не приведены). Напротив, в составе tandemного гибридного дуплекса снижение V_0 при переходе от немодифицированного tandemа $pN_8(1) + pN_4 + pN_2(2)$ к блеомицинсодержащему $pN_8(1) + BImpN_4 + pN_2(2)$ (Рис. 20) значительно менее выражено.

$V_0 \times 10^4$ моль/л·мин



Снижение V_0 может быть обусловлено встраиванием остатка блеомицина в гибридный дуплекс или возникающими стерическими затруднениями.

Рис. 20. Начальная скорость (V_0) гидролиза R20 в комплексах 16-18 в растворе, содержащем 20 мМ Hepes-KOH (pH 8.0), 50 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ дитиотреита при концентрации РНК-матрицы $1 \cdot 10^{-7}$ М, олигодезоксирибонуклеотидов - $2 \cdot 10^{-6}$ М. Реакционные смеси преинкубировали при 20°C в течение 15 мин, затем добавляли 0.15 ед. акт РНКазы Н. Реакцию останавливали осаждением 2% раствором $LiClO_4$ в ацетоне. Электрофорез проводили в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (0.09 М трис- H_3BO_3 , pH 8.3, 8 М мочевины, 40°C).

Эксперименты по термической денатурации гибридных и ДНК-дуплексов, как немодифицированных, так и содержащих ковалентно связанный остаток блеомицина, показывают, что взаимодействие блеомицина с гибридными дуплексами может протекать иначе, чем с двупеочечной ДНК. Оказалось, что значения $T_{пл}$ комплексов, образованных конъюгатом $BImpN_4$ и тетрапуклеотидом pN_4 с ДНК-аналогом матрицы R20 в комплексах 16а и 17а (Рис. 21) совпадают

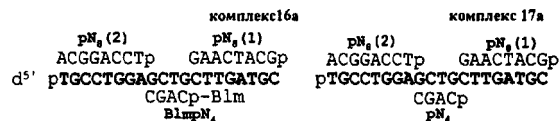


Рис. 21. Структура дуплексов 16а и 17а.

(38°C). Напротив, комплекс, образованный блеомициновым производным тетрапуклеотида с РНК в присутствии эффекторов (комплекс 16), на 3°C менее стабилен, чем комплекс, образованный немодифицированным тетрапуклеотидом (комплекс 17) (см. таблицу 4).

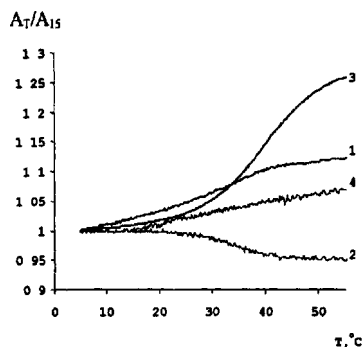


Рис. 21. Изменение нормированного оптического поглощения A_T/A_{15} при термической денатурации ДНК/ДНК-комплекса 16а на длинах волн 300 (1), 320 (2), 270 нм (3) и гибридного РНК/ДНК-комплекса 16а на длине волны 300 нм (4). A_T и A_{15} – оптическое поглощение при данной температуре и при 15°C.

Кроме того, в случае ДНК-дуплекса 16а при длинах волн 300-320 нм выявлен переход в интервале температур 20-45°C (кривые 1 и 2, рис. 22), то есть в том же интервале, что и переход при 270 нм (кривая 3, рис. 22), соответствующий денатурации комплементарного комплекса тетрапуклеотида с ДНК. При денатурации гибридного дуплекса 16 переход при 300-320 нм отсутствует (кривая 4, рис. 22). Наличие такого перехода при термической денатурации комплекса 16а, по-видимому, является следствием bathochromного сдвига соответствующей

полосы ($\lambda_{\text{max}} \approx 310 \text{ нм}$) в спектре поглощения блеомицина при его взаимодействии с ДНК-дуплексом. При термической денатурации комплекса **16a** такой сдвиг приводит к повышению оптической плотности при $\lambda=300$ (кривая 1) и к снижению при $\lambda=320$ (кривая 2). Учитывая, что полоса с $\lambda_{\text{max}} \approx 310 \text{ нм}$ соответствует поглощению битиазольного фрагмента блеомицина, логично предположить, что отсутствие подобного перехода в интегральной кривой термической денатурации комплекса **16** (**R20/pN₈(1) + BImpN₄ + pN₈(2)**) при 300 нм (Рис 22, кривая 4) свидетельствует об отсутствии взаимодействия битиазольного остатка блеомицина с гибридным дуплексом. Таким образом, основной причиной негативного влияния объемного остатка блеомицина на субстратные свойства гибридных дуплексов по отношению к РНКазе Н может быть стерическое воздействие - молекулярная масса остатка блеомицина в виде медьсодержащего комплекса превышает 1500. Ранее отмечалось, что 3'-конец РНК в гибридном дуплексе, является первичным сайтом атаки фермента. Также отмечалось, что наличие 5'-концевой фосфатной группы олигодезоксирибонуклеотида увеличивает эффективность гидролиза РНК РНКазой Н в гибридном дуплексе. Блокирование 5'-концевой фосфатной группы остатком блеомицина также может являться причиной ухудшения субстратных свойств гибридного дуплекса.

Тем не менее, при гидролизе **R20** в комплексах **16** и **17** регистрируются все основные продукты (**p17, p14, p11, p8, p5**) (Рис 23), наблюдающиеся при гидролизе этой же РНК в гибридном дуплексе с соответствующим нативным 20-мером (комплекс **18**). И несмотря на некоторое снижение начальной



Рис. 23. Электрофореграммы гидролиза **R20** РНКазой Н через 15 мин после начала реакции в комплексах **16-18**. Условия реакции см. в подписи к рис. 20.

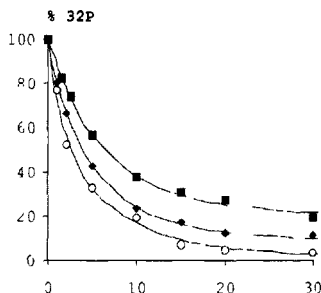


Рис. 24. Кинетические кривые разрушения **R20** РНКазой Н в комплексах **16** (■), **17** (◆) и **18** (○). Условия реакции см. в подписи к рис. 20.

скорости гидролиза РНК-мишени РНКазой Н в гибридном дуплексе с блеомицинсодержащим тандемом, эффективность гидролиза РНК мишени в таком гибридном дуплексе сравнима с эффективностью гидролиза в дуплексе с немодифицированным тандемом и в непрерывном гибридном дуплексе такой же протяженности (Рис 24).

Таким образом, наличие остатка блеомицина не препятствует гидролизу РНК мишени рибонуклеазой Н в тандемных гибридных дуплексах.

4. Расщепление РНК конъюгатами блеомицина с олигодезоксирибонуклеотидами

Неоднократно было показано, что неконъюгированный блеомицин способен расщеплять не только ДНК, но и РНК. Однако, количество сайтов, «узнаваемых» блеомицином, в РНК значительно меньше, чем в ДНК. Ранее не была продемонстрирована возможность расщепления РНК конъюгатами блеомицина с олигонуклеотидами.

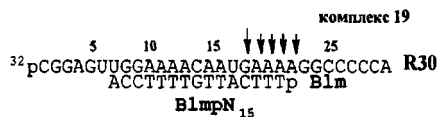


Рис. 25. Структура комплекса 19.

В качестве РНК-мишени для исследования такой возможности был выбран фрагмент R30, гомологичный фрагменту D30 (Рис. 25). Было установлено, что данный фрагмент не расщепляется свободным блеомицином в

интервале концентраций (1-10) 10^{-6} М (данные не приведены)

При обработке фрагмента R30 конъюгатом B1mpN₁₅ наблюдается пять сайтов расщепления (G18 - A22). Степень прямого расщепления мишени R30 составляет 6% (Рис. 26). Дополнительная обработка раствором 0.25 М гидразина, pH 7.8 не привела к увеличению степени расщепления фрагмента (данные не приведены).

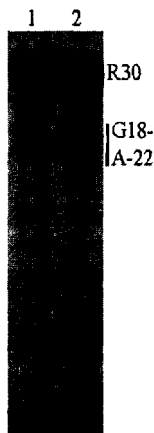


Рис. 26. Результаты электрофоретического разделения в 20% ПААГ продуктов деградации меченой мишени R30 конъюгатом B1mpN₁₅. 1 - R30 в отсутствие конъюгата, 2 - в присутствии B1mpN₁₅. Концентрация B1mpN₁₅ - $1 \cdot 10^{-5}$ М. Реакционные смеси содержат $2 \cdot 10^{-5}$ М R30, 0.2 М LiCl, 0.01 М трис-HCl pH 7.5. Реакцию инициировали одновременным добавлением $1 \cdot 10^{-4}$ М Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ и 0.05 М 2-меркаптоэтанол, инкубировали 3 ч при 20°C.

Таким образом, направленное расщепление РНК конъюгатами блеомицина с олигонуклеотидами возможно, но в данном случае протекает неэффективно.

Известно, что расщепление рибосомальной 5S РНК дрожжей блеомицином протекает по нуклеотидным остаткам U в 5'-GU-3' последовательностях, расположенных перед однонуклеотидными петлями. Для формирования подобной петли в мишени R30 был использован 16-звенный олигодезоксирибонуклеотид N₁₆ (Рис. 27, комплекс 20).

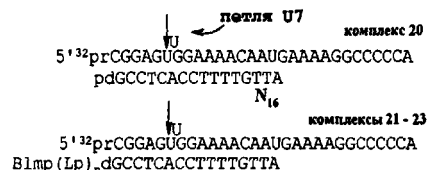


Рис. 27. Структура комплексов 20-23.

В данном комплексе мишень R30 расщепляется неконъюгированным блеомицином по нуклеотидному остатку U6, прилегающему к петле, содержащей остаток U7. Степень прямого расщепления составляет 30%. Здесь и

далее регистрировались только прямые разрывы цепи РНК, наблюдаемые без дополнительных обработок. Следует отметить, что в составе совершенного гибридного дуплекса, образуемого РНК-

мишенью и 17-звенным олигодезоксирибонуклеотидом 3'- dGCCTCAACCTTTTGTTA -5' мишень **R30** не расщепляется некоњуэгированным блеомицином (данные не представлены)

Далее были синтезированы линкерсодержащие конъюгаты $N_{16}(pL)_2pBlm$, $N_{16}(pL)_3pBlm$ и $N_{16}((pL)_4pBlm$, последовательность которых идентична последовательности олигонуклеотида N_{16} . Гибкие линкеры, состоящие из двух, трех или четырех остатков гексаэтиленгликольфосфата были введены в олигонуклеотиды чтобы присоединенный остаток блеомицина мог достичь предполагаемой области расщепления (Рис 1 6, 27) Как видно из рис 28, в присутствии конъюгатов



$N_{16}(pL)_2pBlm$, $N_{16}(pL)_3pBlm$ и $N_{16}(pL)_4pBlm$, наблюдается расщепление мишени **R30** по нуклеотидному остатку У6 Эффективность расщепления зависит от длины линкера, связывающего остаток блеомицина с олигонуклеотидом

*Рис. 28. Радиоавтограф гель-электрофореза продуктов расщепления ^{32}P -меченной мишени **R30** в присутствии: 1 - олигонуклеотида N_{16} и некоњуэгированного блеомицина, 2 - конъюгата $N_{16}(pL)_2pBlm$; 3 - конъюгата $N_{16}(pL)_3pBlm$; 4 - конъюгата $N_{16}(pL)_4pBlm$. Реакционные смеси содержали $2 \cdot 10^{-5}$ М **R30**, 0.2 М **LiCl**, 0.01 М трис-**HCl** pH 7.5. Реакцию инициировали одновременным добавлением $1 \cdot 10^{-4}$ М $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ и 0.05 М 2-меркаптоэтанол, инкубировали 3 ч при 20°C. OH - статистический гидролиз РНК-мишени в 0.2 М $NaHCO_3$, pH 8.9;*

Степень расщепления РНК-мишени в комплексе с конъюгатом $N_{16}(pL)_2pBlm$, достигает 8%, с конъюгатом $N_{16}(pL)_3pBlm$ - 12%, а максимальная эффективность расщепления (18%) достигается в комплексе с олигонуклеотидом $N_{16}(pL)_4pBlm$, содержащим в линкере четыре остатка гексаэтиленгликольфосфата Очевидно, конъюгаты $N_{16}(pL)_2pBlm$, $N_{16}(pL)_3pBlm$ и $N_{16}(pL)_4pBlm$, как и олигонуклеотид N_{16} , образуют с мишенью **R30** дуплекс, содержащий в цепи РНК однонуклеотидную петлю

Степень расщепления РНК-мишени конъюгатом $N_{16}(pL)_4pBlm$ снижается при добавлении олигонуклеотида N_{16} , который конкурирует с конъюгатом $N_{16}(pL)_4pBlm$ за сайт связывания на РНК-мишени Полное подавление расщепления достигается при концентрации олигонуклеотида N_{16} $1 \cdot 10^{-5}$ М Это указывает, что расщепление РНК-мишени конъюгатами $N_{16}(pL)_2pBlm$, $N_{16}(pL)_3pBlm$ и $N_{16}(pL)_4pBlm$ носит комплементарно адресованный характер

Приведенные данные позволяют заключить, что использование олигонуклеотидной части блеомицинсодержащих конъюгатов для формирования несовершенных комплексов, содержащих участки предпочтительного расщепления РНК блеомицином, позволяет осуществлять достаточно эффективное комплементарно адресованное расщепление РНК такими конъюгатами

5. Расщепление двуцепочечной ДНК конъюгатами блеомицина с триплекс-формирующими олигонуклеотидами (ТФО)

Ранее было показано, что степень расщепления двуцепочечной ДНК неконъюгированным блеомицином значительно превышала степень ее расщепления триплекс-формирующими конъюгатами. Мы предположили, что протяженность природного спермидинового линкера, соединяющего остатки

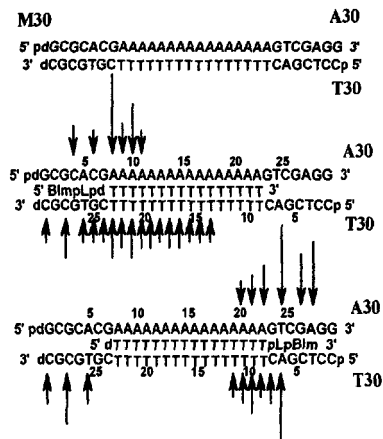
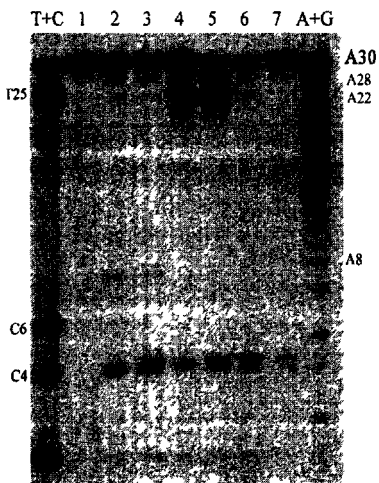


Рис. 29. Мишень М30 и триплексы, образуемые конъюгатами $T_{16}pLpBlm$, $BlmpLpT_{16}$

блеомицина и олигонуклеотида, ограничивает способность остатка блеомицина в составе стандартного конъюгата связываться с ДНК в необходимой конформации. В этом случае увеличение длины линкера могло бы облегчить связывание блеомицина в малой бороздке ДНК и привести к увеличению эффективности ее расщепления блеомицином. Эксперименты по расщеплению двуцепочечной ДНК триплекс-формирующими конъюгатами блеомицина проводились с использованием синтетической двуцепочечной 30-звенной ДНК М30 (Рис 29). Для определения степени расщепления конкретной цепи ДНК использовали ^{32}P -меченые пурин-богатую (А30) или пиримидин-богатую (Т30) цепь.

Было исследовано расщепление мишени М30 стандартными конъюгатами $T_{16}pLpBlm$, $BlmpLpT_{16}$ и линкерсодержащими конъюгатами $T_{16}pLpBlm$ и $BlmpLpT_{16}$.

Рис. 30. Радиоавтограф электрофоретического анализа продуктов расщепления цепи А30 в 20% полиакриламидном геле. Все реакционные смеси содержали 1М LiCl, 0.1М Tris-HCl (pH 7.5), 10мМ MgCl₂ и $3 \cdot 10^{-6}$ М мишени М30. Дорожка 1 - мишень М30 без добавления конъюгата, дорожка 2 - расщепление в присутствии конъюгата $BlmpT_{16}$, дорожка 3 - $BlmpLpT_{16}$, дорожка 4 - $T_{16}pLpBlm$, дорожка 5- $T_{16}pLpBlm$, дорожка 6-е присутствии неконъюгированного блеомицина, дорожка 7 - контрольный конъюгат $Blm-TTTTCATGTTTTTCCA$. Концентрация конъюгатное и свободного блеомицина составляла $1.5 \cdot 10^{-5}$ М. Реакционные смеси перед реакцией были преинкубированы в течение 18 ч при 20°C. Реакционные смеси выдерживали в течение 5 ч при 20°C.



В условиях образования триплекса и в присутствии Fe^{2+} и β -меркаптоэтанола конъюгаты вызывают расщепление ДНК-мишени. Расщепление цепи А30 показано на рис 30, аналогичная картина (данные не приведены) наблюдается для цепи Т30. Расщепление М30 конъюгатами $T_{16}pLpBlm$ и $BlmpLpT_{16}$ протекает по тем же сайтам, что и расщепление конъюгатами $T_{16}pLpBlm$ и $BlmpT_{16}$.

(Рис 30) Конъюгаты **T₁₆pLpBlm** и **BlmpLpT₁₆** расщепляют обе цепи МЗО более эффективно, чем конъюгаты **T₁₆Blm** и **BlmT₁₆** (Рис 31) Например, линкерсодержащий конъюгат **T₁₆pLpBlm** расщепляет 61 % цепи АЗО, тогда как степень расщепления этой же цепи стандартным конъюгатом **T₁₆Blm** составляет лишь 41 %

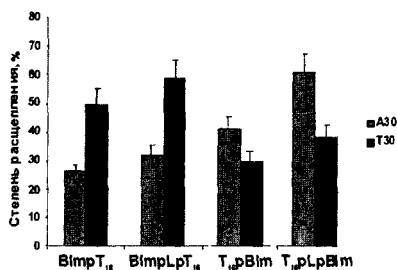


Рис. 31. Степень расщепления цепей А30 и Т30 конъюгатами BlmpLpT₁₆ и T₁₆pLpBlm в сравнении с конъюгатами BlmpT₁₆ и T₁₆pBlm.

В условиях избытка конъюгата обе цепи мишени подвержены слабому неспецифическому расщеплению. Эти «неспецифические» сайты повреждаются также в реакции с неконъюгированным блеомицином (степень расщепления достигает 34 %, рис 30, дорожка 6) и контрольным конъюгатом, не образующим триплекса (до 5 %, рис 30, дорожка 7)

Таким образом, расщепление целевой ДНК новыми конъюгатами, содержащими гексаэтиленгликольфосфатные линкеры, протекает до 1,5

раз более эффективно, чем расщепление стандартными конъюгатами

5. Выводы

1 Созданы и исследованы тандемные системы, содержащие конъюгаты коротких олигонуклеотидов с блеомицином А₃ и олигонуклеотидные эффекторы

Показано, что независимо от длины и последовательности олигонуклеотидного адреса, все исследованные конъюгаты в составе тандемных комплексов сайт-специфически взаимодействуют с комплементарными ДНК-мишенями, многократно вызывая расщепление мишени в области связывания конъюгата. Наибольшую эффективность (деструкция более 6 молекул ДНК-мишени одной молекулой конъюгата в составе тандема) проявляют конъюгаты блеомицина с тетра nukлеотидами, расщепляющие ДНК-мишень в собственном сайте связывания. Установлено, что ключевыми факторами, определяющими эффективность таких конъюгатов в составе тандемов являются, с одной стороны, высокая степень ассоциации комплекса конъюгат ДНК-мишень, обеспечиваемая эффекторами, и, с другой стороны, быстрая диссоциация реагента из комплекса с поврежденной ДНК мишенью

2 Синтезированы конъюгаты нового типа, в которых остаток блеомицина А₃ присоединен к олигонуклеотиду через линкер, состоящий из остатков гексаэтиленгликольфосфата (от одного до четырех остатков). Показано, что линкерсодержащие конъюгаты блеомицина с гексадекатимидилатом более эффективно расщепляют обе цепи ДНК в составе триплекса по сравнению со стандартными конъюгатами

3 Впервые продемонстрировано, что конъюгаты блеомицина с олигодезоксирибонуклеотидами способны вызывать сайт-специфическое расщепление фрагмента РНК

Показано, что эффективность расщепления РНК линкерсодержащими конъюгатами может быть существенно (до 3 раз) повышена за счет формирования олигонуклеотидной частью конъюгата в

цепи РНК одонуклеотидных петель, являющихся сайтами предпочтительного связывания остатка блеомицина

4 Исследовано расщепление РНК рибонуклеазой *HE coli* в непрерывных и tandemных гибридных дуплексах с олигонуклеотидами, несущими на 5'-концевой фосфатной группе остаток блеомицина. Показано, что наличие остатка блеомицина не препятствует гидролизу РНК мишени рибонуклеазой H в tandemных комплексах, и снижает его скорость в 34 раза в случае непрерывных комплексов

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1 Воробьев П Е, Маркушин Ю Я, Сергеев Д С, Зарытова В Ф Повышение эффективности сайт-специфического расщепления ДНК-мишени блеомициновым производным тетрауклеотида с помощью олигонуклеотидов-эффекторов // Биоорганическая химия 1996 Т22 №2 С 111-116

2 Sergeyev D S , Vorobjev P E, Zarytova V F Superactive ohgonucleotide derivatives //Nucleosides Nucleotides 1997 V 16 №7-9 P 1575-1577

3 Воробьев П Е , Зарытова В Ф Расщепление РНК в составе гибридных дуплексов рибонуклеазой H E coli I Субстратные свойства комплексов, образованных РНК и tandemом коротких олигонуклеотидов//Биоорганическая химия 2000 Т26 №10 С 656-661

4 Воробьев П Е, Пышный Д В , Викстром Э, Зарытова В Ф Расщепление РНК в составе гибридных дуплексов рибонуклеазой H E coli III Субстратные свойства гибридных дуплексов РНК и олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих остаток блеомицина A5 // Биоорганическая химия 2002 Т 28 №4 С 332-340

5 Воробьев П Е, Пышная И А, Викстром Э, Зарытова В Ф Направленное расщепление РНК в несовершенном комплементарном комплексе конъюгатами блеомицина A5 с олигонуклеотидом // Известия Академии Наук Серия химическая 2002 № 7 С 1097-1099

6 Vorobjev P E, Zarytova V F Bleomycin-ohgonucleotide conjugates as site-specific nucleases // Artificial nucleases / Ed M A Zenkova Berlin, Heidelberg Springer 2004 P 269-287

7 Vorobjev P E, Smith J B, Pyshnaya I A, Levina A S , Zarytova V F, Wickstrom E Site-Specific Cleavage of RNA and DNA by complementary DNA-bleomycin A₅ conjugates // Bioconjugate Chem 2003 V 14 №6 P 1307-1313

8 Vorobjev P, Tchaika O, Zarytova V Efficient cleavage of dsDNA by bleomycin conjugated via hexaethylene glycol linker to triplex-forming oligonucleotides // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2004 V 23 №6-7 P 1051-1055

Подписано к печати «24 » марта 2005 г
Формат бумаги 60х84 16 Объем 2 печ. л.
Тираж 100 экз. Заказ № 1413
Отпечатано «Документ Сервис», 630090
г. Новосибирск ул. Институтская 41 тел. 356-600

02.00



22 APR 2005