



УДК 577.113.4

РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МЕТИЛФОСФАТНЫЕ  
ГРУППЫIII \*. АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДНК-МИШЕНИ  
4-(N-МЕТИЛ-N-2-ХЛОРЕТИЛАМИНО)БЕНЗИЛ 3'-  
И 5'-ФОСФАМИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОКТАТИМИДИЛАТА,  
СОДЕРЖАЩИМИ МЕТИЛФОСФОНАТНЫЕ ОСТАТКИ

Амиржанов Н. В., Зарьтова В. Ф.

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР*

Осуществлена аффинная модификация  $^{32}\text{P}$ -меченого  $\text{pC}_5\text{A}_5\text{C}_5$  метилфосфонатными производными октатимидилата, содержащими на 3'- или 5'-конце алкилирующий остаток азотистого иприта. Показано, что предельная степень алкилирования в большой мере зависит от конфигурации метилфосфонатного фрагмента и в случае  $R_p$ -изомера может достигать 90%. Выявлено, что позиционная направленность алкилирования практически не отличается от позиционной направленности алкилирования реагентами на основе олигонуклеотидов с фосфодиэфирными природными связями.

В последние годы идет интенсивный поиск производных олигонуклеотидов, способных воздействовать на экспрессию генов за счет образования комплементарных комплексов с НК [4–7]. Одним из первых таких подходов и, вероятно, более эффективным, является использование для этих целей реакционноспособных производных олигонуклеотидов, способных не только давать комплементарные комплексы, но и затем образовывать прочную ковалентную связь с НК-мишенью [8–10].

С целью создания реагентов направленного воздействия на генетический аппарат клетки ранее нами был осуществлен синтез реакционноспособных производных олигонуклеотидов, содержащих в своем составе одновременно алкилирующий остаток азотистого иприта и метилфосфонатные группы [4] с регулярной конфигурацией при атомах Р.

В данной работе впервые продемонстрирована аффинная модификация НК-мишени метилфосфонатными аналогами олиготимидилатов, содержащими на 3'- или 5'-конце остаток 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламина.

В качестве воздействующих на НК-мишень производных олигонуклеотидов использовали соединения (Ia–д) и (IIa–д) (схема 1) [4]. Реагенты (Ia, б) и (IIa, б) представляют собой индивидуальные диастереомеры, содержащие три метилфосфонатных остатка либо только с  $R_p$ - ((Ia) и (IIa)), либо только с  $S_p$ - ((Iб) и (IIб)) конфигурацией атома фосфора. Реагенты (Iв) и (IIв) представляют собой смесь из 8 диастереомеров. Реагенты (Iг) и (IIг) содержат в своем составе 6 метилфосфонатных остатков и представляют собой смесь из 64 диастереомеров. (Iд) и (IIд) — реагенты, содержащие фосфодиэфирные связи.

\* Сообщение II см. [1]. Сокращения: НК — нуклеиновая кислота,  $\text{CH}_2\text{RCl}$  — 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензил,  $p$  — метилфосфонатный остаток в нуклеотидах; для соединений с известной конфигурацией при атомах фосфора использованы обозначения  $p'$  и  $p''$ , соответствующие  $R_p$ - и  $S_p$ -конфигурациям при атомах Р в метилфосфонатном фрагменте  $\text{TrT}$  (отнесение — см. [2, 3]). В работе использованы олигонуклеотиды только дезоксирибоза; префикс «d» перед названием олигонуклеотидов опущен.

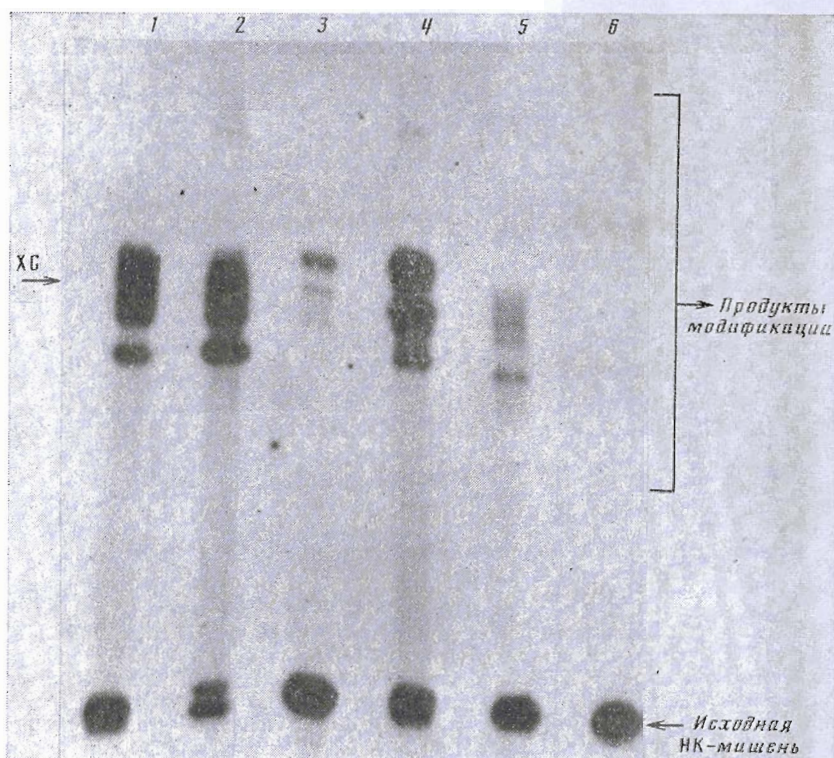


Рис. 1. Электрофореграмма (20% ПААГ, содержащий 7 М мочевины) продуктов алкилирования (64 ч, 20°С)  $[5\text{-}^{32}\text{P}]\text{pC}_3\text{A}_8\text{C}_5$  реагентами (Iд, а-г) (дорожки 1-5 соответственно) исходного олигонуклеотида (III) (6). Концентрация реагентов  $2 \cdot 10^{-5}$  М, олигонуклеотида  $3 \cdot 10^{-5}$  М

НК-мишеню в данной работе служил модельный олигонуклеотид (III) (схема 1), имеющий в своем составе октаденилатную последовательность, комплементарную олиготимидилатной части реагентов (I) и (II), и участки олигоцитидилатов, способных модифицироваться азотистым ипритом [11]. В отличие от  $\text{oligo}(\text{dA})$ - и  $\text{poly}(\text{dA})$ -последовательностей, использовавшихся ранее [9, 10] в качестве НК-мишени при оценке реакционной способности RCl-производных этиловых эфиров олиготимидилатов, олигонуклеотид (III) обеспечивает однозначность связывания реагентов типа (I) и (II) и как следствие этого возможность выявления позиционной направленности модификации.

Алкилирование олигонуклеотида (III) реагентами (I) и (II) проводили в условиях образования комплементарных комплексов типа А и Б (схема 1). Матрицу (III),  $^{32}\text{P}$ -меченную по 5'-концу, модифицировали, следя за ходом реакции по данным электрофореза. Продукты модификации октадекануклеотида (III) (рис. 1) имеют меньшую электрофоретическую подвижность, чем исходный октадекануклеотид (III), и могут быть, таким образом, зарегистрированы и выделены из реакционной смеси с помощью электрофореза.

После установления факта модификации НК-мишени полученными реагентами необходимо было выяснить влияние  $\text{CH}_3\text{-PO}_2$ -групп с  $R_p$ - и  $S_p$ -конфигурацией при атомах фосфора на предельную степень модификации и определить позиционную направленность алкилирования.

Предельную степень модификации олигонуклеотида (III) реагентами (I) определяли в интервале температур 5-40°С. Реакцию проводили в течение времени, достаточного для практически полного превращения RCl-фрагмента в гидролизованной водой продукт [12]. Реакционную смесь анализировали с помощью электрофореза (рис. 1). Полосы геля, содержащие исходную матрицу и продукты алкилирования, вырезали и измеряли



их радиоактивность. По соотношению количества метки в полосах геля определяли степень модификации матрицы. На рис. 2 представлены кривые зависимости предельной степени модификации матрицы (III) реагентами (Ia—д) от температурного режима реакции.

Видно, что для всех исследованных реагентов предельная степень модификации максимальна при низкой и минимальна при высокой температуре. Существенно ниже степень модификации в исследуемом диапазоне температур для реагентов (Iб, г), т. е. для реагента с  $S_p$ -конфигурацией при атомах фосфора и реагента, имеющего шесть  $CH_3$ -Р-группировок. Реагент (Iа) ( $R_p$ -изомер) по эффективности модификации (рис. 2, кривая 1) не уступает реагенту (Iд) (кривая 2), полученному из октатимидилата с природными фосфодиэфирными связями. В случае использования реагента (Iв) (смесь из 8 диастереомеров), вероятно, существенный вклад в модификацию (кривая 3) вносят реагенты с  $R_p$ -конфигурацией.

Полученные данные (рис. 2) алкилирования НК-мишени реагентами (Iа—д) хорошо коррелируют с величинами термической денатурации аналогов олиготимидилатов, на основе которых сконструированы эти реагенты. Так, например, для  $S_p$ -изомера  $Tr(TrTr'')_3TrSCH_3$  в комплексе с олигонуклеотидной матрицей  $d(C_5A_5C_5)$   $T_{пл} < 3^\circ C$ , а для  $R_p$ -изомера  $Tr(TrTr')_3TrSCH_3$   $20^\circ C$  [1]. Таким образом, в исследуемом случае, как

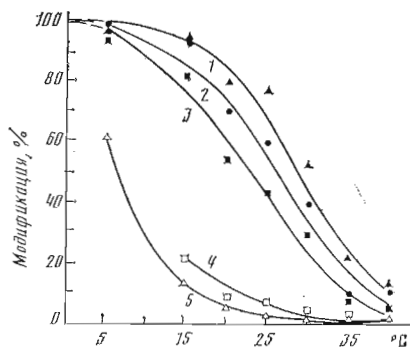


Рис. 2. Зависимости предельной степени модификации от температуры при алкилировании олигонуклеотида (III) реагентами (Iа, д, в, б, г) (1—5 соответственно). Условия модификации см. в подписи к рис. 1

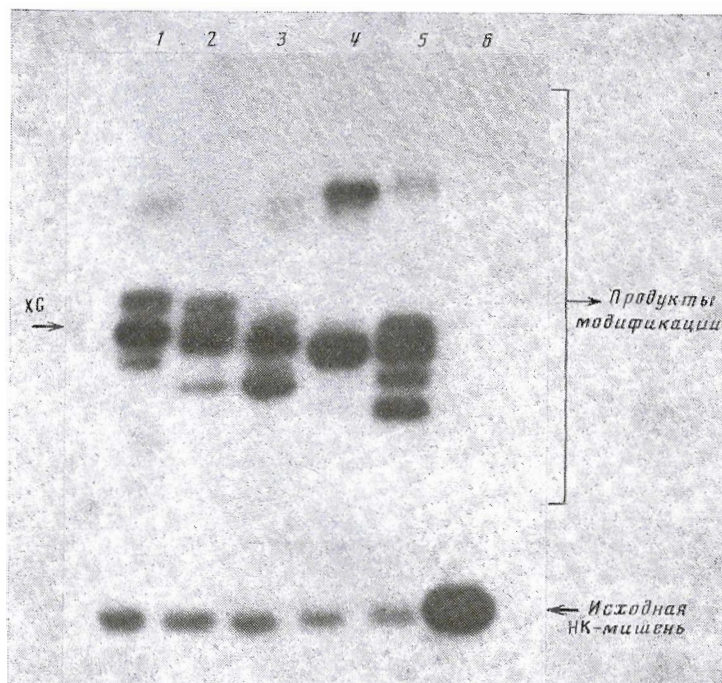


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов модификации (15 сут,  $5^\circ C$ ) олигонуклеотида (III) 3'- и 5'-фосфамидными реагентами (Iд, в, а) и (Iд, в) (дорожки 1—5 соответственно) и исходного олигонуклеотида (III) (6). Концентрации приведены в подписи к рис. 1

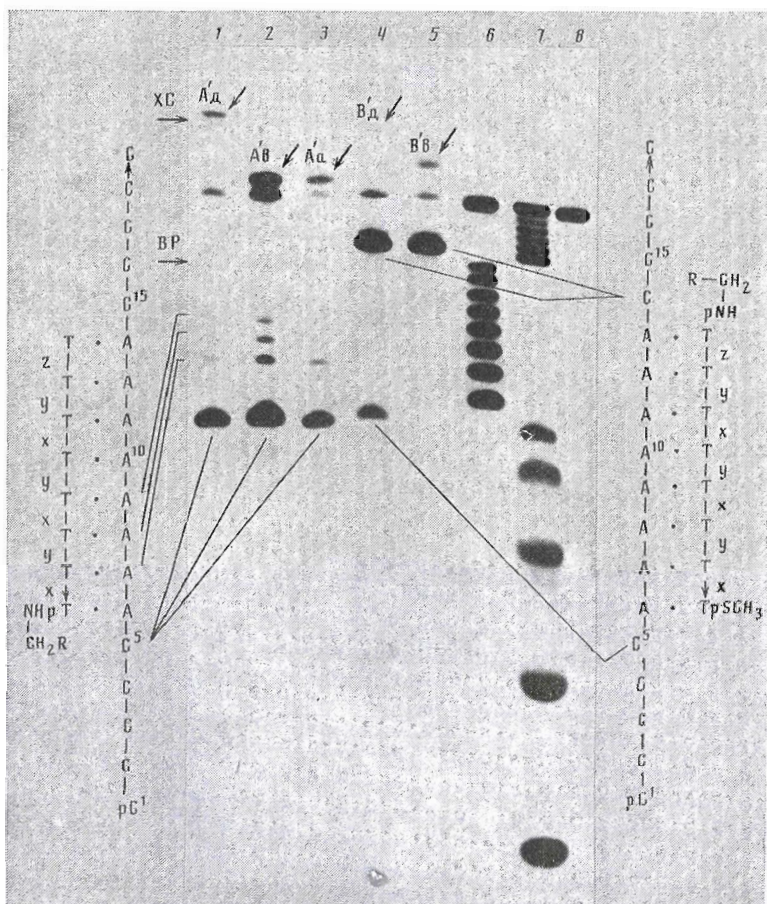


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов расщепления модифицированного (условия см. в подписи к рис. 3) реагентами (Iд, в, а) и (IIд, в) олигонуклеотида (III) с дальнейшей обработкой реакционных смесей последовательно гидразингидратом и пиперидином (дорожки 1-5 соответственно), продуктов частичного расщепления олигонуклеотида (III) по остаткам пуринов (6) и пиримидинов (7), а также исходного олигонуклеотида (III) (8)

и в случае реагентов на основе олигонуклеотидов с природными межнуклеотидными связями, эффективность алкилирования во многом определяется прочностью комплекса, образованного НК-мишенью и реагентом.

Для исследования позиционной направленности алкилирования НК-мишени были использованы 3'- и 5'-реагенты в виде смеси  $R_p$ - и  $S_p$ -изомеров ((Iв) и (IIв)). Кроме того, дополнительно исследованы продукты модификации реагентом (Iа) ( $R_p$ -изомер). В качестве контролей взяты реагенты (Iд) и (IIд), полученные на основе фосфодиэфирных олигонуклеотидов. Модификацию матрицы (III) проводили при 5° С, поскольку при этой температуре достигается максимальная предельная степень (до 90%) алкилирования (рис. 2, 3.) Реакционную смесь непосредственно после завершения алкилирования подвергали последовательной обработке гидразингидратом (для расщепления по N<sup>3</sup>-алкилцитидинам [13]) и пиперидином (для расщепления цепи по алкилированным пуринам [14]), навосили на 20% ПААГ и подвергали электрофорезу (рис. 4). Полосы, соответствующие определенной длине расщепленной цепи олигонуклеотида (III), вырезали и измеряли их радиоактивность (рис. 5). Из рис. 4 и 5 видно, что алкилирование в случае 3'-фосфамидных реагентов (Iа, в), как и в случае (Iд), идет преимущественно по остатку С<sup>5</sup> олигонуклеотида (III); 42% для (Iа), 39% для (Iв) и 55% для (Iд) (рис. 4, 3, 2, 1; рис. 5а, б, а),

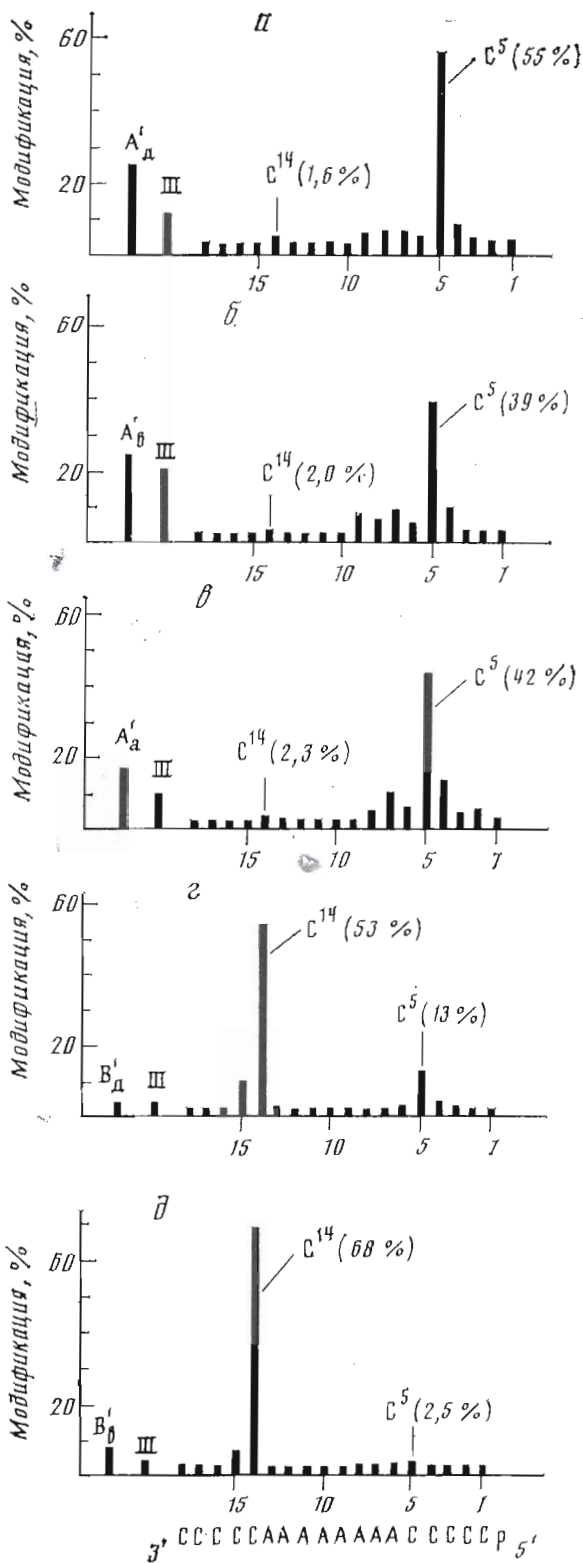


Рис. 5. Распределение продуктов расщепления модифицированного олигонуклеотида (III) по модифицированным основаниям (числа по оси абсцисс обозначают номер основания, считая с 5'-конца олигонуклеотида), полученное при сканировании дорожек ПААГ, радиоавтограмма которого представлена на рис. 4, дорожки 1-5 (а-д соответственно)





в случае же 5'-фосфамидных реагентов (IIв) и (IIд) — по C<sup>14</sup> основания: 68% для (IIв) и 53% для (IIд) (рис. 4, 5 и 4; рис. 5д, е).

В исследуемых условиях помимо основных образуется еще несколько продуктов модификации мишени, количество каждого из которых в отдельности не превышает 0–25% (рис. 4, 5). В случае 3'-реагентов (Iд, в, а) в небольшой степени алкилируются адениновые (рис. 4, 1–3; рис. 5а – в) и цитидиновые (рис. 5а – в) основания, прилегающие к остатку C<sup>5</sup> мишени. В случае 5'-реагентов для (IIд) обнаружена модификация (13%) по C<sup>5</sup> (рис. 4, 4; рис. 5г), что, вероятно, связано с алкилированием в тройном комплексе В [15] (схема 2).

Кроме того, после элиминирования модифицированных оснований (в случае как 3'-, так и 5'-реагентов) обнаружены продукты, характеризующиеся более низкой электрофоретической подвижностью, чем исходная немодифицированная матрица (III) (рис. 4, 5, продукты А' д, в, а и В' д, в), структура которых нами не установлена. Можно предположить, что это продукты модификации 5'-концевой фосфатной группы мишени: для 3'-реагентов — при образовании комплекса А, для 5'-реагентов — в случае тройного комплекса В. Различие в подвижности этих продуктов модификации (рис. 4) может быть связано с гидролизом метилфосфонатных фрагментов в щелочных условиях при обработке реакционной смеси пиперидином.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что позиционная направленность алкилирования комплементарной НК-мишени алкилирующими производными метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов практически не отличается от позиционной направленности алкилирования реагентами на основе олигонуклеотидов с фосфодиэфирными связями. Более эффективным реагентом среди двух диастереомеров может служить метилфосфонатное производное с R<sub>p</sub>-конфигурацией метилфосфонатного фрагмента.

### Экспериментальная часть

Синтез и основные характеристики использованных в работе олигонуклеотидов и их алкилирующих производных описаны ранее [1].

<sup>32</sup>P-Меченый олигонуклеотид (III) получали по методике [16], используя [γ-<sup>32</sup>P] АТФ (до 3000 Ки/ммоль), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78; НИКТИ БАВ, г. Бердск).

Модификацию *октадекануклеотидной мишени (III)* реакционноспособными производными (I) или (II) проводили в буфере, содержащем 0,2 М NaCl, 0,01 М трис-НСl (рН 7,4), 0,01 М MgCl<sub>2</sub> [10] (рис. 1, 3). Предельную степень модификации определяли после инкубации реакционной смеси в течение более пяти периодов полупревращения реагента в гидролизованый водой продукт. Время необходимое для проведения реакции алкилирования при различных температурах (5, 15, 20, 25, 30, 35 и 40° С), было рассчитано по методу [12] и составляло 15 сут, 5 сут, 60, 29, 14, 8,5 и 4,8 ч соответственно.

Реакционные смеси подвергали электрофорезу в 20% ПААГ (7 М мочевины, 0,05 М трис-борат (рН 8,5), 1 мМ EDTA, рис. 1, 3, 4). После радиоавтографии (пленка РМ-1) участки геля, содержащие радиоактивный материал, вырезали и измеряли их радиоактивность в толуальном сцинтиляторе, используя счетчик Mark III (Nuclear Chicago, США).

Расщепление модифицированного *додекануклеотида* по остаткам алкилированных пуринов проводили при 95–100° С 10% водным раствором пиперидина [14] в течение 10–16 ч по остаткам N<sup>3</sup>-алкилцитидинов — обработкой модифицированной мишени смесью гидразингидрат — диоксан — вода, 2 : 1 : 1 (по объему) в течение 1,5–2 ч при 0° С с последующей обработкой пиперидином, как описано в работе [13]. Продукты частичного расщепления цепи по пуринам получали, обрабатывая олигонуклеотид 30–40 мин 2% раствором дифениламина в 66% водной муравьиной кислоте при 37° С [17]. Для получения продуктов частичной деструкции олигонуклеотидной цепи по остаткам пиримидинов применяли последовательно

обработку гидразингидратом (37° С, 30–40 мин), а затем пиперидином при 95–100° С в течение 30–40 мин [14]. По завершении указанных процедур олигонуклеотидный материал выделяли осаждением, добавляя 10–15-кратный избыток (по объему) 2% перхлората лития в ацетоне, растворяли в формамиде и подвергали электрофорезу.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 259–266.
2. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 267–276.
3. Lesnikovski Z. J., Wolkanin P. J., Stec W. J. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 45. P. 5535–5538.
4. Jayaraman K., McParland K., Miller P. S., Ts'О P. O. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1537–1541.
5. Miller P. S., Agris C. H., Aurelian L., Blake K. R., Murakami A., Reddy M. P., Spitz S. A., Ts'О P. O. P. // Biochemie. 1985. V. 67. № 7/8. P. 769–776.
6. Agris C. H., Blake K. R., Miller P. S., Reddy M. P., Ts'О P. O. P. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 20. P. 6268–6275.
7. Zon G. // J. Protein Chem. 1987. V. 6. № 2. P. 131–145.
8. Grineva N. I., Karpova G. G. // FEBS Lett. 1973. V. 32. № 2. P. 352–355.
9. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1512–1522.
10. Абрамова Т. В., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Пичко Н. П., Федорова О. С. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 12. С. 1642–1649.
11. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212–1220.
12. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чмигова Т. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210–214.
13. Kirkegaard K., Bus H., Spassky A., Wang J. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 9. P. 2544–2548.
14. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
15. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. С. 292.
16. Murakami A., Blake K. R., Miller P. S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 15. P. 4041–4046.
17. Коробко В. Г., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1420–1422.

Поступила в редакцию  
13.VII.1988.

#### REACTIVE OLIGONUCLEOTIDES BEARING METHYLPHOSPHONATE GROUPS.

#### III. AFFINITY MODIFICATION OF NUCLEIC ACID TARGET BY 4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYL-3'- AND 5'-PHOSPHOAMIDE DERIVATIVES HAVING STEREOREGULAR METHYLPHOSPHONATE RESIDUES

AMIRKHA NOV N. V., ZARYTOVA V. F.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR*

Modification of 5'-<sup>32</sup>P-labelled octadecadeoxyribonucleotide d(pC<sub>5</sub>A<sub>8</sub>C<sub>5</sub>) (III) with octathymidylate methylphosphonate derivatives bearing both 3'- and 5'-terminal alkylating 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylphosphoamide residue has been investigated. Yield in the modification depends on configuration of methylphosphonate fragment, in case of R<sub>p</sub>-isomer it may amount to 90%. Specificity of alkylation of nucleic acid target (III) by reagents based on the oligonucleotide methylphosphonates is almost the same as by reagents based on the oligonucleotides having phosphodiester internucleotide bonds.