



УДК 547.963.32.057:577.113.4:535.217

## АКТИВАЦИЯ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ «ВКЛЮЧАЕМОГО» ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО РЕАГЕНТА ДЛЯ АДРЕСОВАННОЙ МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ошевский С. И.

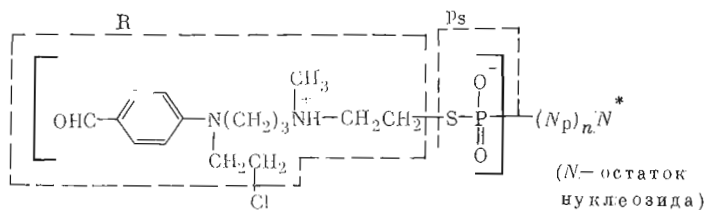
*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Показано, что предложенные ранее «включаемые» восстановлением ароматической формильной группы алкилирующие олигонуклеотидные реагенты, содержащие остаток ароматического азотистого иприта, могут активироваться и при облучении их светом азотного лазера ( $\lambda$  337 нм). При активации их в комплексе с полинуклеотидом-мишенью происходит адресованная модификация последнего. Позиционная направленность модификации зависит от способа активации реагента (восстановление боргидридом или облучение светом лазера).

Развитие метода адресованной модификации нуклеиновых кислот [1] связано с созданием новых олиго- и полинуклеотидных реагентов. Можно выделить особую группу — реагенты с «включаемой» модифицирующей (алкилирующей) функцией [2–7]. Одним из путей развития могут быть разработка и использование новых способов активации уже известных «включаемых» реагентов.

Реагенты с «включаемой» алкилирующей функцией в основном представлены олигонуклеотидными производными типа (I) и (II), несущими остатки  $N,N,N'$ -трис(2-хлорэтил)- $N'$ -(*n*-формилфенил)триметилендиамина и  $N$ -метил- $N,N'$ -бис(2-хлорэтил)- $N'$ -(*n*-формилфенил)триметилендиамина [8]. Реакционная способность ароматической 2-хлорэтиламиногруппы алкилирующих диаминов и их олиго- полинуклеотидных производных (I) и (II) относительно низка [4, 5, 7, 8]. Ее активация осуществляется восстановлением альдегидной группы до спиртовой действием боргидрида натрия в мягких условиях: она может быть активирована после образования комплементарного комплекса олиго- или полинуклеотидного реагента и ДНК-мишени, что приводит к алкилированию последней [5, 9].

Реагенты (II) с остатком азотистого иприта, присоединенным по 5'-тиофосфатному остатку олигодезоксирибонуклеотида, были предложены



в работе [7]. С их помощью впервые исследована адресованная химическая модификация фрагмента однонитевой ДНК определенной первичной структуры [9].

Цель данной работы — изучение возможности активации модифицирующей функции реагента (II) лазерным излучением, а также позиционной направленности его действия на комплементарную ДНК-мишень.

В работе [10] показана принципиальная возможность фотоактивируемого лазером адресованного алкилирования ДНК производным олигонук-

\* Префикс «d» («дезокс») для простоты опущен.



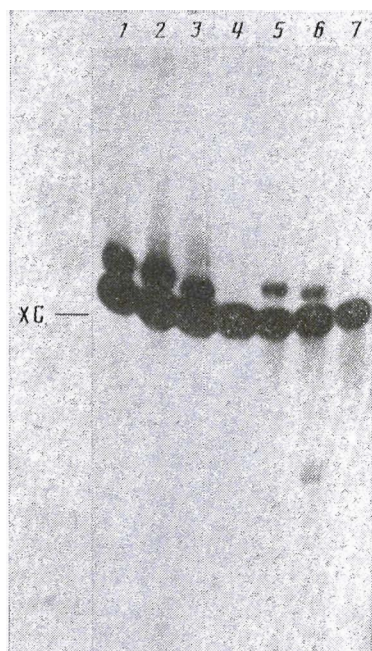


Рис. 1

Рис. 1. Продукты модификации полинуклеотида (V) олигонуклеотидным реагентом (IV), полученные при облучении лазером в течение 1 (1) и 2 ч (2) и при активировании мишени боргидридом натрия (3); 4 – исходный комплекс (V)·(IV); 5–7 – продукты модификации (1, 3) и исходный комплекс после обработки 10% пиперидином. Радиоавтограф 15% ПААГ с 7 М мочевиной. ХС – ксиленицианол FF (пробег 6,5 см)

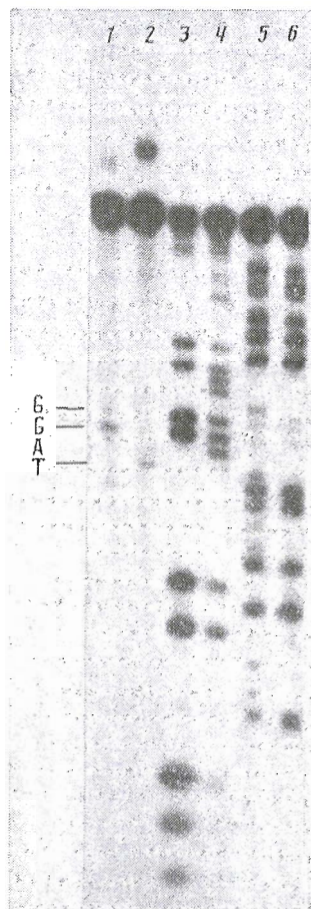


Рис. 2

Рис. 2. Локализация мест модификации полинуклеотида (V) олигонуклеотидным реагентом (IV). Радиоавтограф 15% ПААГ с 7 М мочевиной (пробег ксиленицианола FF 11 см). 1 – продукты модификации реагентом (IV), активированным восстановлением боргидридом натрия, 2 – продукты фотоиницированной модификации, остальные дорожки – продукты расщепления по Максему – Гилберту 5'-<sup>32</sup>P-меченой мишени (V). Стрелками показаны основные продукты расщепления, образовавшиеся в результате адресованной модификации

Для точной локализации этих мест продукты обработки пиперидином еще раз анализировали по методу [9], используя в качестве контроля продукты реакций расщепления 5'-<sup>32</sup>P-мишени по Максему – Гилберту [12, 13] (рис. 2). Основным местом фотоиницированной модификации, которое удается идентифицировать таким способом, является остаток Т<sup>24</sup>, комплементарный 5'-концевому остатку аденозина олигонуклеотидного реагента. В гораздо меньшей степени модифицируются основания G<sup>26</sup> и G<sup>27</sup>. Механизм и продукты фотоиницированной модификации ДНК такими реагентами не изучены. По аналогии с данными работы [10] можно предполагать, что происходит активация 2-хлорэтиламиногруппы и последующее алкилирование основания нуклеиновой кислоты. В связи с этим расщепление ДНК по остатку Т<sup>24</sup> может показаться несколько неожиданным. Однако расщепление ДНК по остаткам тимидина в результате адресованного алкилирования ее олигонуклеотидным реагентом с «включаемой» алки-

лирующей функцией активированным восстановлением боргидридом натрия и последующей обработкой пиперидином наблюдалось и ранее в работе [14]. По-видимому, механизм расщепления связан с фактом, описанным в монографии [15]. При алкилировании тимидин-5'-фосфата алифатическим 2-хлорэтиламином  $(C_2H_5)_2NCH_2CH_2Cl$  кроме продукта модификации тимидина по N<sup>3</sup>-положению образуется 1-N-(диэтиламиноэтил)тимин (предположительно за счет первоначального алкилирования по фосфатной группе и последующего внутримолекулярного переноса алкильного остатка с расщеплением N-гликозидной связи).

При алкилировании мишени олигонуклеотидным реагентом, активированным восстановлением боргидридом натрия, модифицируется и выпещляется преимущественно основание G<sup>26</sup>, в меньшей степени G<sup>27</sup> (рис. 2, I).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что предложенные нами ранее [7] «включаемые» алкилирующие олигонуклеотидные реагенты (см. формулу на с. 387) можно активировать светом азотного лазера ( $\lambda$  337 нм) и в этом варианте активации использовать для адресованной модификации нуклеиновых кислот. Выход реакции составляет ~20% при концентрациях мишени и олигонуклеотидного реагента, близких к эквимолярным. Изменение способа активации реагента приводит к изменению позиционной направленности модификации ДНК-мишени. Важно, что основные точки модификации находятся вблизи друг от друга. Таким образом возникла возможность влиять на селективность реакции адресованной модификации ДНК, не изменяя олигонуклеотидный реагент.

Вывод о возможности активации лазерным излучением реагентов типа (II), по-видимому, справедлив и для других олиго-, полинуклеотидных реагентов как (I), так и (II) типа с другими способами присоединения ароматического азотистого иприта (например, по 3'-концевой тиофосфатной группе олигодезоксирибонуклеотидов [16] и смешанных олигорибо(дезоксирибо)нуклеотидов [17] или через основания РНК- или ДНК-адреса [5, 18]). Возможно, что предлагаемый способ активации олиго-, полинуклеотидных реагентов — производных типа (I) и (II) — окажется полезным при их использовании в системе *in vivo*.

### Экспериментальная часть

В работе использовали аденозин-5'-[ $\gamma$ -тио] трифосфат (Boehringer, ФРГ), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] АТФ с удельной радиоактивностью 3000 Ки/ммоль отечественного производства, полинуклеотидкиназу фага Т4, ДНК-лигазу фага Т4 (НИКТИ БАВ, Бердск). Полинуклеотидную мишень собирали лигированием трех 16-звенных олигонуклеотидов удельной радиоактивности 10 Ки/ммоль ДНК-лигазой фага Т4, как описано в работе [11], и выделяли электрофорезом в ПААГ. N-Метил-N,N'-бис(2-хлорэтил)-N'-(*n*-формилфенил)триметилендиамин любезно предоставлен А. А. Галлем (НИБХ). Олигонуклеотидный реагент (CIR)<sub>p</sub>AGGAAGCGCAAGGCC (IV) получали по методике [7]. Остальные использованные в работе препараты имели квалификацию не ниже х.ч.

*Адресованная модификация ДНК-мишени олигонуклеотидным реагентом и анализ продуктов модификации.* 4 мкл раствора, содержащего 8 мкМ 5'-<sup>32</sup>P-меченую ДНК-мишень (V) и 7 мкМ олигонуклеотидный реагент (IV) в 0,15 М калий-фосфатном буфере, рН 7,5, облучали 1 ч в кварцевой кювете диаметром 1,8 мм в условиях, приведенных в работе [10], светом азотного лазера с  $\lambda$  337 нм (средняя мощность 3 мВт, частота следования импульсов 100 нс). Отбирали половину реакционной смеси и облучали еще 1 ч. В контрольном эксперименте олигонуклеотидный реагент (IV) в комплексе с мишенью в тех же концентрациях активировали, добавляя 1/10 объема 1 М раствора боргидрида натрия и реакционную смесь инкубировали 10 ч при 32° С [9].

После проведения реакций модификации к аликвотам реакционных смесей и к аликвоте комплекса мишени с реагентом (IV) добавляли ДНК-носитель, осаждали спиртом, растворяли в 90% формамиде с маркерными красителями для электрофореза и прогревали 1 мин при 100° С. Анализ



продуктов модификации проводили электрофорезом в ПААГ (рис. 1, 1-4). Параллельно аликвоты реакционных смесей и исходного комплекса после осаждения спиртом обрабатывали 30 мин при 100° С 10% пиперидином и вновь осаждали спиртом (дважды). Осадок растворяли в 90% формамиде с красителями, прогревали 1 мин при 100° С и также анализировали электрофорезом в ПААГ (рис. 1, 5-7; рис. 2, 1, 2).

Автор благодарен д-ру А. Р. Шеффнеру (Институт биохимии, Мюнхен) за препарат аденозин-5'-[γ-тио] трифосфата, Н. В. Бульчеву (НИБХ) за выполнение эксперимента по облучению и интерес к работе, а также В. П. Кумареву и В. Ф. Кобзеву за предоставленные олигодезоксирибонуклеотиды.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I.* // Tetrahedron Lett. 1967. № 37. P. 3557-3562.
2. *Asseline V., Lelarie M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N. T., Montenay-Garestier T., Helene C.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 11. P. 3297-3301.
3. *Dreyer G. B., Dervan P. B.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 968-972.
4. *Ошевский С. И., Грачев М. А., Мустаев А. А.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 7. С. 958-965.
5. *Салганик Р. И., Дианов Г. Л., Курбагов В. А., Шишкин Г. В., Галль А. А.* // Докл. АН СССР. 1978. Т. 239. № 1. С. 217-219.
6. *Summerton J., Bartlett P. A.* // J. Mol. Biol. 1978. V. 122. № 2. P. 145-172.
7. *Ошевский С. И., Галль А. А., Шишкин Г. В.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1265-1268.
8. *Галль А. А., Курбагов В. А., Мустаев А. А., Шишкин Г. В.* // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1979. № 4. Вып. 2. С. 99-104.
9. *Грачев М. А., Ошевский С. И.* // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 5. С. 1259-1262.
10. *Бульчев Н. В., Горн В. В., Кутявин И. В., Лебедев А. В.* // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1988. № 19. Вып. 6. С. 124-129.
11. *Кумарев В. П., Ривкин М. И., Амирханов Н. В., Баранова Л. В., Богачев В. С., Кобец М. Л., Ошевский С. И., Обухова Л. В., Рыбаков В. Н., Кузнецов К. Д., Вершинина С. И., Гулевич В. В.* // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. № 1. С. 244-249.
12. *Махат А. М., Gilbert W.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560-564.
13. *Чувпило С. А., Кравченко В. В.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1634-1437.
14. *Ошевский С. И.* Химико-ферментативный синтез алкилирующих производных олигонуклеотидов. Дис. канд. хим. наук. НИБХ, 1985. С. 130.
15. *Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шibaев В. Н.* Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970. С. 376-377.
16. *Власов В. В., Галль А. А., Годовиков А. А., Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Моговилова И. П., Шишкин Г. В.* // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 5. С. 1244-1247.
17. *Ошевский С. И., Богачев В. С., Кумарев В. П.* // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1190-1198.
18. *Мазин А. В., Дианов Г. Л., Салганик Р. И.* // Молекулярн. биология. 1981. Т. 15. Вып. 1. С. 252-256.

Поступила в редакцию

5.III.1988

После доработки

2.VIII.1988

## LASER ACTIVATION OF «SWITCH ON» OLIGONUCLEOTIDE REAGENT FOR ADDRESSED MODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS

OSHEVSKI S. I.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Properties of oligonucleotide reagents containing an alkylating group of regulated reactivity (nitrogen mustard residue activatable upon mild borohydride reduction of the aromatic formyl group) have been studied. It was shown that these reagents can also be activated by irradiation with nitrogen laser light (λ 337 nm). Activation of the reagent in complex with a target polydeoxyribonucleotide resulted in the addressed chemical modification of the target. The positional direction of the modification depended on the way of the activation (borohydride reduction or laser irradiation).