



УДК 547.963.057:577.6:544

© 1994 г. А. С. Левина, Д. Р. Табатадзе,
В. Ф. Зарытова, М. И. Добриков, В. Н. Горн,
Л. М. Халимская *

КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ АРИЛАЗИДНЫМИ И ПЕРФТОРАРИЛАЗИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

III.* ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ РЕАГЕНТЫ С ФОТОАКТИВНОЙ ГРУППОЙ НА КОНЦЕ ИЛИ ВНУТРИ ЦЕПИ; ТАНДЕМЫ РЕАГЕНТОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск;
* Новосибирский государственный университет

Исследована фотомодификация олигонуклеотидов-мишеней реагентами, содержащими *n*-азидотетрафторбензамидную группу в разных положениях олигонуклеотидного адреса: на 5'- или 3'-концевом фосфате или при С5-атоме остатка дезоксиуридина на 5'-конце или внутри цепи. Показано, что реагенты, несущие фотоактивную группу внутри олигонуклеотидной цепи, способны эффективно модифицировать мишень (50—55% образования ковалентных аддуктов реагента с мишенью). Более эффективными оказались производные олигонуклеотидов с фотоактивной группой на 5'- или 3'-конце (70% — образование ковалентных аддуктов). Модификации предпочтительно (30—40%) подвергается остаток гуанозина мишени, расположенный вблизи перфторарилазидной группы и не вовлеченный в образование дуплекса. При использовании тандема реагентов, комплементарных соседним участкам мишени, модифицируется преимущественно тот же остаток гуанозина, причем степень модификации достигает 80%.

Олигонуклеотидные производные, содержащие арилазидные группы, являются перспективными реагентами для сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот, поскольку они обладают высоким квантовым выходом [2]. Однако описанные в литературе арилазидные реагенты действуют с низкой эффективностью [3, 4]. В предыдущих работах [1, 5] мы предложили новые, перфторарилазидные олигонуклеотидные реагенты, которые, как было показано, эффективно модифицируют ДНК-мишень в комплементарном дуплексе.

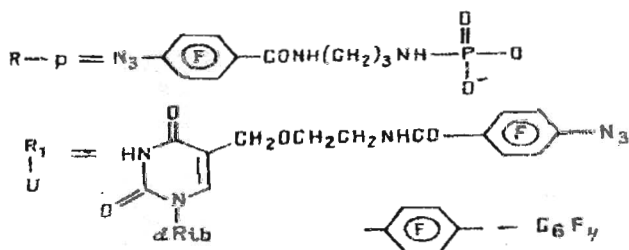
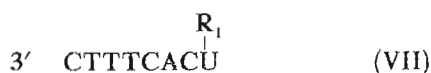
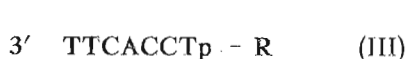
В настоящей работе рассмотрена фотомодификация пентадека- и гексадекануклеотидов (I) и (II) реагентами, содержащими *n*-азидотетрафторбензамидную группу в разных положениях олигонуклеотида-адреса: на 5'- или 3'-концевом фосфате (реагенты (III)**, (IV) и (V)), при С5-атоме дезоксиуридина на конце (реагент (VII)) или внутри цепи (реагенты (VI) и (VIII)), а также с помощью пар

* Сообщение II см. [1].

В статье используются только олигонуклеотиды дезоксирибы, префикс «d» везде в обозначении олигонуклеотидов опущен.

**Данные получены в работе [5].

реагентов, комплементарных соседним участкам мишени (тандемы реагентов (III + IV) и (III + V)).



Все реагенты образуют с мишенями стабильные дуплексы (т. пл. 24—30° С). Поскольку фотомодификацию проводили при температуре 4° С, значительно меньшей температуры плавления, можно полагать, что реагенты находятся в момент реакции в дуплексе с мишенью.

При облучении реакционной смеси светом ртутной лампы в области 303—365 нм во всех случаях образуются продукты ковалентного присоединения к мишени одного реагента (фракция Y) и двух реагентов одновременно (фракция Z) в случае тандемов (рис. 1—3).

На примере реагента (V) показано, что высокая степень образования ковалентных аддуктов (65%) достигается уже при 2-кратном избытке реагента по отношению к мишени (табл. 1). Увеличение избытка реагента (V) до 10 эквивалентов повышает степень модификации до 73%. При использовании тандема реагентов соотношение олигонуклеотидов (III) : (V) : (I), равное 2 : 2 : 1, дает еще более высокую степень образования ковалентных аддуктов (80%) (табл. 1). Таким образом, использование тандемов позволяет увеличить эффективность модификации мишени.

Как видно из табл. 2, степень модификации 5'- или 3'-реагентами (III, IV, V) примерно одинакова (около 70%).

Уменьшение ковалентных сшивок в случае реагента (VI) (55%) по сравнению с реагентами (III) — (IV) (табл. 2) не может быть связано с тем, что фотоактивная группа присоединена к остатку дезоксиуридина, а не к фосфатной группе [5]. Более низкая степень модификации реагентом (VI) — следствие того, что модифицируемое основание вовлечено в образование дуплекса. С этим согласуется тот факт, что реагент (III) модифицирует преимущественно основание G² и в гораздо меньшей степени G³, находящееся также внутри дуплекса [1, 5].

Аналогичные результаты были получены при фотомодификации гексадекануклеотида (II) с помощью олигонуклеотидных реагентов (VI) и (VIII). В данном случае также наблюдается уменьшение образования ковалентных аддуктов при использовании реагентов (VIII), в котором фотоактивная группа присоединена к остатку дезоксиуридина внутри цепи (51%), по сравнению с реагентом (VII), содержащим перфторарилазидную группу на 5'-концевом нуклеозиде (69%) (рис. 3, табл. 2).

Для получения информации о позиционной направленности фото-

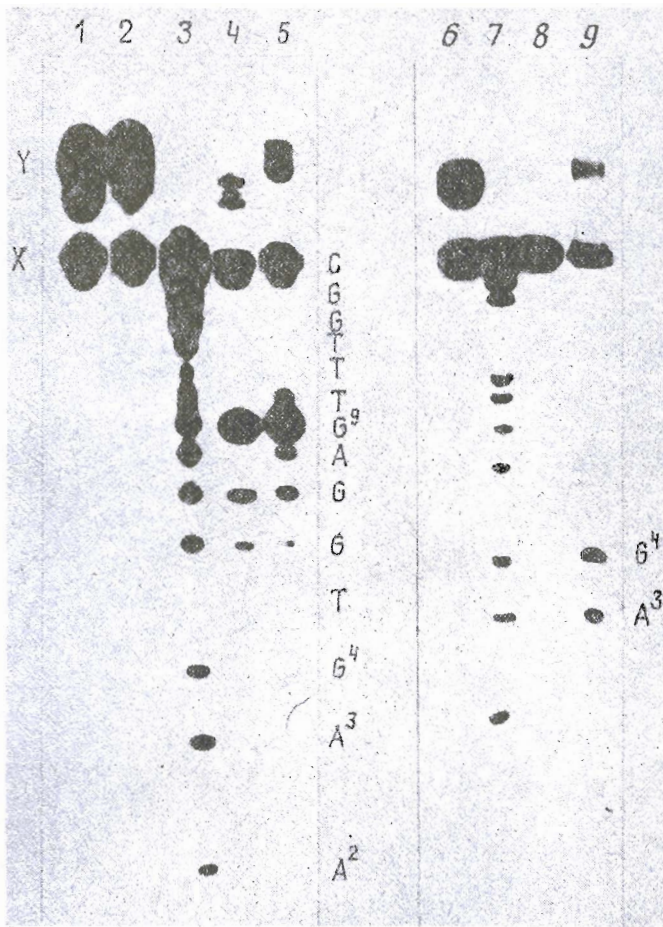


Рис. 1. Радиоавтограф продуктов фотомодификации мишени TAAGTGGAGTTTGGC (1) реагентами (IV, V, VI) до (1, 2, 6) и после (4, 5, 9) обработки пиперидином. 3 и 7 — продукты деградации мишени по остаткам пуринов, 8 — исходная мишень. Полосы X и Y совпадают по подвижности с исходной мишенью и продуктами присоединения реагента к мишени соответственно

модификации реакционные смеси после облучения обрабатывали пиперидином. При этом, так же как в предыдущих работах [1, 5], происходит расщепление мишени по модифицированным сайтам; ковалентные аддукты (Y) расщепляются не полностью, т. е. обнаруживаются щелочестабильные продукты модификации, составляющие 10—12% от радиоактивности дорожки геля (рис. 1—3, табл. 2).

В случае реагентов (III)—(V) и тандемов (III + IV) и (III + V) основной точкой модификации мишени (I), приводящей к образованию щелочелabileных продуктов, является гуаниновый остаток G⁹ (рис. 1, дорожки 4, 5; рис. 2, дорожки 3, 4; табл. 2). При использовании реагента (V) и тандема (III + V) направленность воздействия на остаток G⁹ усиливается (ср. строки 1, 2 и 5 со строками 3 и 6 в табл. 2). Это дополнительно свидетельствует о том, что перфторарилазидная группа предпочтительнее модифицирует остаток гуанозина, не вовлеченный в образование дуплекса.

Если реакционноспособная группа присоединена к остатку дезоксиуридина внутри цепи, как в реагенте (VI), то модифицируются расположенные вблизи нее

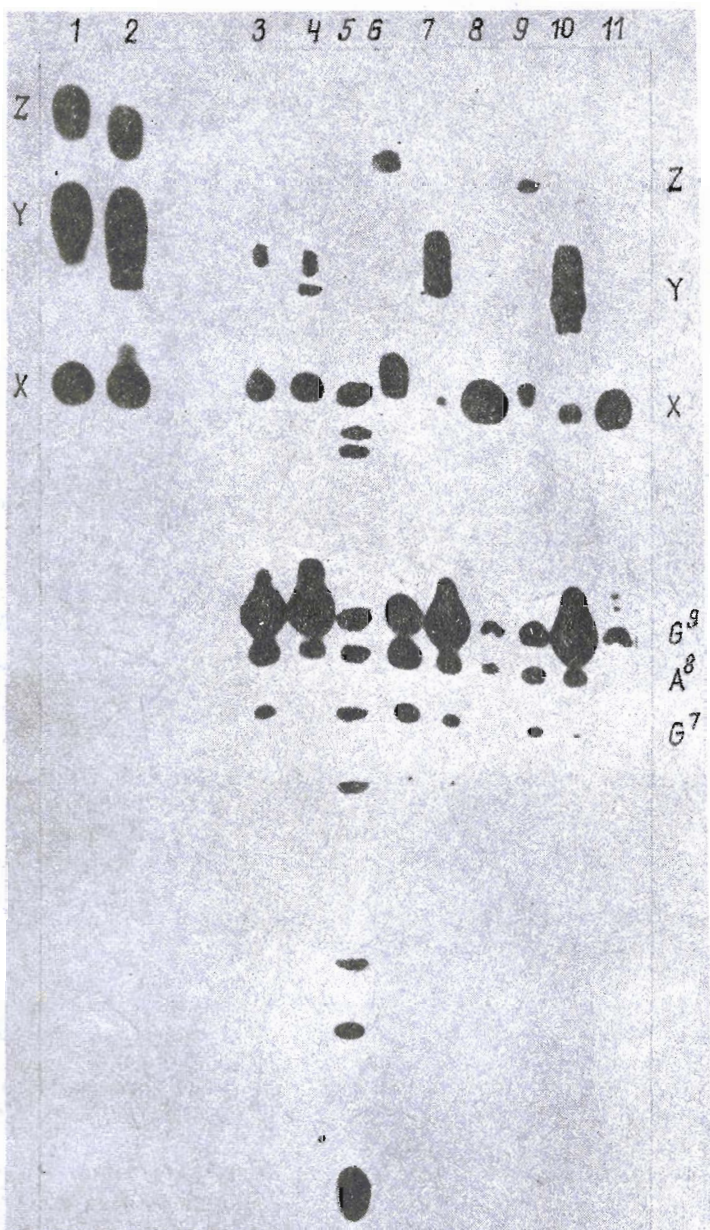


Рис. 2. Радиоавтограф продуктов фотомодификации мишени TAAGTGGAGTTTGGC (1) с помощью тандемов реагентов (III + IV) и (III + V). Дорожки 1, 2 — до обработки пиперидином, остальные дорожки — после обработки пиперидином всей реакционной смеси (3, 4), фракций Z (6, 9), Y (7, 10) и X (8, 11). Первая цифра относится к тандему (III) + (IV), вторая — к тандему (III) + (V). 5 — продукты деградации мишени по остаткам пуринов. Полосы X, Y, Z совпадают по подвижности с исходной мишенью, продуктами присоединения одного реагента и двух реагентов соответственно

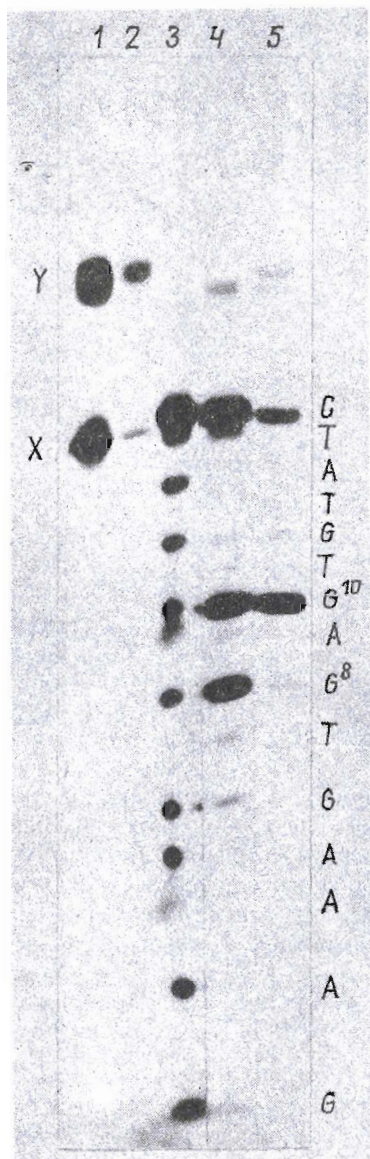


Рис. 3. Радиоавтограф продуктов фотомодификации мишени AGAAAGTGAGTGTATC (II) реагентами (VIII) и (VII) до (1, 2) и после (4, 5) обработки пиперидином. 3 — продукты деградации мишени по остаткам пуринов. Полосы X и Y совпадают по подвижности с исходной мишенью и продуктами присоединения реагента к мишени соответственно

основания мишени, причем направленность модификации проявляется менее четко (рис. 1, 9; табл. 2). Такая же закономерность обнаруживается при фотомодификации мишени (II) реагентами (VII) и (VIII). В случае реагента (VII), содержащего фотоактивную группу на 5'-концевом нуклеозидном остатке, основной точкой модификации мишени является основание G¹⁰; G⁸ модифицируется в незначительной степени (рис. 3, 5, табл. 2). В то же время под действием реагента (VIII), в котором активная группа находится в середине цепи, основания G⁸ и G¹⁰ модифицируются приблизительно одинаково, причем степень модификации каж-

Степень образования ковалентных аддуктов при фотомодификации мишени (I)
 TAAAGTGGAGTTTGGC реагентами (V) и (III + V) *

Реагент	(V)			(III + V)			
Молярное отношение реагент/мишень	2	5	10	0,7 + 0,7	2 + 2	5 + 5	10 + 10
Ковалентные аддукты, %	65	70	73	65	80	80	80

* Буфер — 0,16 М NaCl, 0,02 М KH_2PO_4 , 0,1 мМ EDTA, pH 7,4; концентрация мишени $5 \cdot 10^{-6}$ М, температура 4° С.

дого из них заметно меньше, чем остатка G^{10} при использовании реагента (VII) (рис. 3, 4, табл. 2).

Таким образом, оптимальным из рассмотренных вариантов для направленного воздействия на ДНК-мишени может быть использование реагентов типа (V) и особенно тандема реагентов типа (III + V).

Как было показано в предыдущей работе [1], модификация ДНК-мишени арилизидными реагентами включает несколько типов повреждений: скрытую модификацию, не приводящую к образованию ковалентных аддуктов реагент-мишень и проявляющуюся при обработке реакционных смесей пиперидином; ковалентное присоединение адреса к мишени, дающее щелочестабильные и щелочелабильные аддукты. Последние при обработке пиперидином расщепляются по модифицированным основаниям; частично при этом образуется продукт, совпадающий по подвижности с исходной мишенью. Это было обнаружено при обработке пиперидином отдельных фракций реакционной смеси, полученных при электрофоретическом разделении продуктов реакции.

Аналогичный анализ был проведен в настоящей работе для тандемов реагентов (III + IV) и (III + V). После элюции из геля пиперидином обрабатывали отдельно фракции X, Y и Z (см. рис. 2), совпадающие по подвижности соответственно с исходной мишенью, с продуктами ковалентного присоединения к мишени одного и одновременно двух олигонуклеотидных реагентов.

Количество продуктов ковалентного присоединения одного из реагентов составляет $\approx 50\%$ (рис. 2, фракция Y), а обоих реагентов — $\approx 30\%$ (рис. 2, фракция Z).

При анализе фракций X обнаруживается скрытая модификация, затрагивающая, как и в случае реагента (III) [5], в основном остаток G^9 ; она составляет примерно 10% от радиоактивности дорожки геля (рис. 2, 8, 11). Пиперидиновая обработка фракций Y и Z выявляет щелочестабильные аддукты, продукты модификации по различным основаниям и соединения, близкие по подвижности к исходной мишени (рис. 2, 6, 7, 9, 10). Щелочелабильные продукты фракций Y — результат модификации в основном по остатку G^9 (рис. 2, 7 и 10), как и при использовании по отдельности реагентов (III), (IV) и (V). Во фракциях Z обнаруживаются продукты модификации по основаниям G^9 , A^8 и G^7 в сопоставимых количествах (рис. 2, 6 и 9). Поскольку фракция Z образуется из Y, то, вероятнее всего, при использовании тандема реагентов первый из них присоединяется к основанию G^9 , а второй может связываться, кроме того, с остатками A^8 и G^7 . Тот факт, что после пиперидиновой обработки фракции Z фиксируется продукт расщепления по G^9 , свидетельствует о том, что оба реагента могут ковалентно присоединяться к одному и тому же основанию G^9 . (В том случае, когда хотя бы один из реагентов присоединяется не к G^9 , а к G^7 или A^8 , обнаруживаются продукты расщепления по основаниям G^7 и A^8 .)

Изложенные результаты свидетельствуют о том, что эффективность модификации мишени мало зависит от того, к какому концу олигонуклеотида (3'-

Фотохимическая пентадеканулолетида (I) и гексадеканулолетида (II) реагентами, содержащими перфторарилзамещенную группу*

Комплексы	Ковалентные звукты, %	Щелоче- стабильные продукты, %	Щелочелазильные продукты, %							
			основные точки модификации							
			A ³	G ⁴	G ⁷	A ⁸	G ⁹	T ¹⁰	G ⁸	G ¹⁰
1. (I) · (III) **	67	15			5	6	29	< 5		
2. (I) · (IV)	70	15			6	5	28	< 5		
3. (I) · (V)	70	20			6	< 5	39	< 5		
4. (I) · (VI)	55	15	9	17						
5. (I) · (III) · (IV)	80	15			7	8	27	5		
6. (I) · (III) · (V)	80	19			< 5	5	40	< 5		
7. (II) · (VII)	69	14							4	30
8. (II) · (VIII)	51	9							16	20

* Приведенные в таблице величины рассчитаны при условии: 100% — сумма площадей всех пиков на денситограмме. Приведены усредненные данные 3—5 экспериментов; отклонения не превышают 5%. Условия реакции см. в подпункте к табл. 1. При использовании тандемов концентрации реагентов были $1 \cdot 10^{-5}$ М; во всех других случаях — $5 \cdot 10^{-5}$ М.

** Данные получены в работе [2].

или 5'-) присоединена перфторарилазидная группа. Олигонуклеотиды, содержащие фотоактивную группу внутри цепи, являются несколько менее эффективными реагентами. Использование тандемов повышает степень модификации мишени при меньшем избытке реагентов. Фотомодификации предпочтительно подвергается остаток G мишени, не участвующий в образовании комплементарной пары.

Экспериментальная часть

В работе использовали олигонуклеотиды, синтезированные фосфитамидным или Н-фосфонатным методом на синтезаторе «Виктория-6М» [6]. N-Оксисукцинимидный эфир *n*-азидотетрафторбензойной кислоты любезно предоставлен Т. А. Приходько (НИБХ СО РАН). Остаток пропилендиамин присоединяли к концевому фосфату олигонуклеотида в соответствии с работой [7]. Присоединение *n*-азидотетрафторбензоильной группы к аминоконцевому концу проводили как описано в работе [1]. Коэффициенты молярного поглощения олигонуклеотидов (ϵ) рассчитывали по методу [8]. Значения ϵ_{260} для олигонуклеотидов, содержащих арилизидогруппу, считали равными сумме значений ϵ_{260} для немодифицированного гептануклеотида и амида азидотетрафторбензойной кислоты ($\epsilon_{260} = 23\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) [9].

Фотомодификацию олигонуклеотида-мишени и анализ продуктов модификации проводили как описано в работах [1, 5]. Образец (10 мкл), содержащий $5'$ - ^{32}P -меченый олигонуклеотид ($5\cdot 10^{-6}\text{ M}$) и соответствующий перфторарилазидосодержащий олигонуклеотид ($5\cdot 10^{-5}\text{ M}$) в буфере 0,16 M NaCl, 0,02 M Na_2HPO_4 , 0,1 mM EDTA (pH 7,5), помещали в 1-мм кварцевую кювету, охлаждаемую вместе с металлическим кюветодержателем до 4°C и экспонировали фильтрованным светом ртутной лампы ДРК-120 с расстояния 20 см. Для облучения использовали набор стеклянных светофильтров БС-12, УФС-1 (303—365 нм). Источник света — ОИ-18А «ЛОМО», мощность $W_{303-365} = 5\cdot 10^{-4}\text{ Вт}\cdot\text{см}^{-2}$. Время экспозиции 5 мин. Пробы подвергали электрофорезу в денатурирующем ПААГ. Денситометрические профили дорожек радиоавтографа получали, используя лазерный сканер (LKB Ultrascan XL, Швеция). Степень модификации по данному положению мишени после обработки пиперидином (табл. 2) определяли как отношение площади пика на денситограмме для соответствующей полосы к суммарной площади всех пиков (%). Так же определяли количество продуктов во всех других фракциях.

Фракции X, Y и Z (рис. 2) выделяли из геля элюцией 0,3 M раствором LiClO_4 , содержащим 6% тригона X-100; затем каждую фракцию обрабатывали пиперидином и подвергали гель-электрофорезу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добриков М. И., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Приходько Т. А., Шишкин Г. В., Табатадзе Д. Р., Заалишвили М. М. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 9. С. 1190—1198.
2. Добриков М. И., Шишкин Г. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1990. Вып. 6. С. 50—58.
3. Praseuth D., Perrouault L., Le Doan T., Chassignol M., Thuong N. T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 5. P. 1349—1353.
4. Keana J. F. V., Qi S. K. // J. Fluorine Chem. 1989. V. 43. № 1. P. 151—154.
5. Добриков М. И., Зарытова В. Ф., Комарова Н. И., Левина А. С., Лохов С. А., Приходько Т. А., Шишкин Г. В., Табатадзе Д. Р., Заалишвили М. М. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 4. С. 540—548.
6. Веньяминова А. Г., Горн В. В., Зенкова М. А., Комарова Н. И., Репкова М. Н. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 941—950.
7. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Мальцева Т. В., Халимская Л. М. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1246—1252.

8. Cantor C. R., Tinoko I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65—77.
9. Levina A. S., Tabatadze D. R., Khalimskaya L. M., Prichodko T. A., Shishkin' G. V., Alexandrova L. A., Zarytova V. P. // Bioconjugate Chem. In press.

Поступила в редакцию
5.V.1993

A. S. Levina, D. R. Tabatadze, V. F. Zarytova,
M. I. Dobrikov, V. V. Gorn, L. M. Khalimskaya *

**SITE-SPECIFIC PHOTOMODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY
ARYLAZIDE AND PERFLUORO ARYLAZIDE DERIVATIVES OF
OLIGONUCLEOTIDES. III. OLIGONUCLEOTIDE REAGENTS WITH A
TERMINAL OR INTERNAL PHOTOACTIVE GROUP**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk; * Novosibirsk State University, Novosibirsk*

Photomodification of target oligonucleotides with reagents bearing *p*-azidotetrafluorobenzamide group at various positions of the oligonucleotide address was investigated. The photoactive group was attached to the 5'- or 3'-terminal phosphate or at the C5-position of a deoxyuridine residue at the 5'-end or inside the oligonucleotide chain. The reagents with the internal photoactive group modified the target with 50—55% efficiency (fraction of covalent adducts reagent-target), whereas the derivatives with a terminal reactive group were more effective (70%). The main point of the modification was the guanosine residue of the target which located near to the photoactive group and was not involved into the duplex formation. Tandems of reagents which are complementary to neighbouring sites of the target modify predominantly the same guanosine residue, with up to 80% extent.