



УДК 547.963.32.07.57:577.113.4

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПЕРФТОРАРИЛАЗИДНУЮ ГРУППУ ПРИ С8-АТОМЕ ДЕЗОКСИАДЕНОЗИНА И ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ИМИ ФРАГМЕНТОВ ДНК

© 1999 г. А. С. Левина[#], Т. В. Васильева, В. Ф. ЗарытоваНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
Новосибирск, 630090, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 25.03.98 г. Принята к печати 25.07.98 г.

Получены гептадезоксинуклеотиды, содержащие алифатическую аминогруппу в 8-положении остатка дезоксиаденозина: $A^{LNH_2}CTTTCT, CTCA^{LNH_2}CTT, ACASTCA^{LNH_2}$, где $L = NH(CH_2)_n, n = 3, 5, 7$. К аминогруппе в составе олигонуклеотидов присоединен остаток 4-азидотетрафторбензойной кислоты и проведена фотомодификация ДНК-мишени полученными реагентами. Показано, что длина спейсера влияет на степень фотомодификации мишени; оптимальным является спейсер с $n = 5$. Максимальная степень модификации (65%) достигается при использовании реагента, содержащего фотоактивную группу на 5'-концевом остатке дезоксиаденозина.

Ключевые слова: олигонуклеотиды, фотоактивные производные; ДНК, фотомодификация; дезоксиаденозин, 8-замещенный.

Для ряда исследований в области молекулярной биологии используются производные олигонуклеотидов различными реакционноспособными группировками. Перспективны для сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот олигонуклеотиды, содержащие фотоактивируемые группы [1–3]. Преимущество таких реагентов – способность вступать в реакции только при облучении светом, причем длину волны облучения можно варьировать в зависимости от природы реагента.

Привлекательными кажутся производные олигонуклеотидов, в которых модифицирующая группа присоединена к одному из гетероциклических оснований таким образом, чтобы не нарушалась его способность участвовать в комплексообразовании. В этом случае модифицирующие группы можно вводить в одно или несколько мест олигонуклеотидной цепи.

Описаны методы синтеза производных олигонуклеотидов, содержащих фотоактивную группу при С5-атоме дезоксиуридина и при С8-атоме аденозина [4, 5]. В работе [3] исследована фотомодификация нуклеиновых кислот с помощью производных, несущих 5-модифицированный дезоксиуридин. Показано, что олигонуклеотиды с присоединенной 4-азидотетрафторбензоильной

группой – эффективные реагенты для сайт-специфической фотомодификации ДНК-мишеней; степень модификации достигает 70–75%.

В настоящей работе описан метод синтеза олигодезоксирибонуклеотидных производных, содержащих перфторарилазидную группировку с аминокспейсером различной длины в положении 8 остатка дезоксиаденозина и исследована фотомодификация модельного олигонуклеотида с помощью полученных реагентов.

С целью введения модифицированного дезоксиаденозина в олигонуклеотид были синтезированы *N*-фосфонаты (IVa)–(IVв) (схема).

Бромирование дезоксиаденозина получали 8-бромдезоксиденозин (I) [6]. После блокирования 5'-гидроксигруппы в соединении (I) был синтезирован *N*-фосфонатный мономер (II) по стандартной методике [7]. Обработка мономера (II) диаминами с разной длиной углеводородной цепи приводит к образованию соответствующих аминокпроизводных дезоксиаденозина (IIIa)–(IIIв). После блокирования аминогруппы с помощью этилового эфира трифторуксусной кислоты были получены *N*-фосфонатные синтоны (IVa)–(IVв). Значения химического сдвига (δ 2.4 м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия расщепления ($J_{P,H}$ 607 Гц) в спектрах ^{31}P -ЯМР соединений (IVa)–(IVв) совпадают с соответствующими величинами, приведенными в литературе для *N*-фосфонатов [8].

Префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (e-mail: Levina@niboch.nsc.ru; тел.: (3832) 39-62-75).

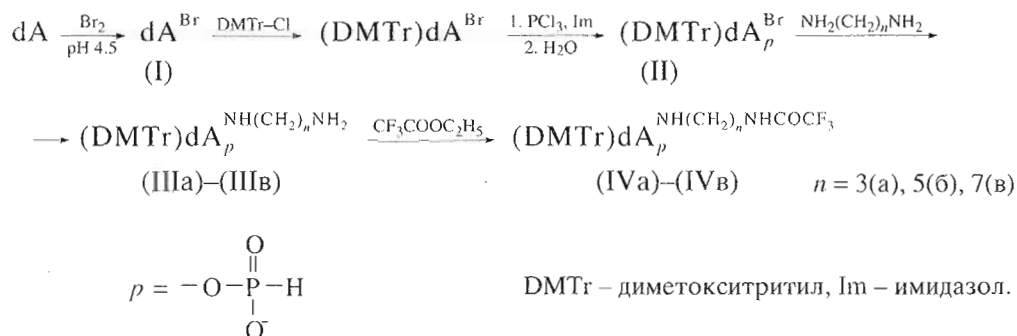
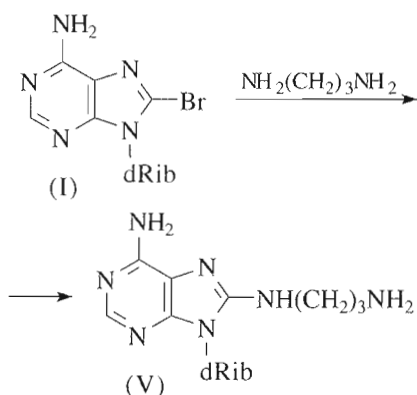


Схема.

Предварительно было показано, что замещение брома на аминоспейсер в 8-положении дезоксиаденозина проходит при 90°C за 8–9 ч практически с количественным выходом.



Наличие аминогруппы в продукте (V) подтверждено нингидриновым тестом. В его УФ-спектре наблюдается смещение максимума поглощения по сравнению с 2'-дезоксаденозином в длинноволновую область (с 260 до 280 нм). В спектре ¹H-ЯМР соединения (V) (табл. 1) кроме сигналов, соответствующих протонам дезоксирибозы и протону во втором положении гетероцикла, имеются сигналы, принадлежащие протонам метиленовых групп алифатического аминоспейсе-

ра, и отсутствует сигнал, соответствующий протону в 8-положении дезоксиаденозина.

Используя полученные синтоны (IVa)–(IVb) наряду со стандартными *H*-фосфонатными мономерами, синтезировали гептануклеотиды (VIa)–(VIb), (VIIa)–(VIIb) и (VIIIa)–(VIIIb), содержащие модифицированный дезоксиаденозин на 5'- или 3'-конце или внутри цепи. Строение продуктов было подтверждено анализом нуклеозидного состава с помощью ферментативного гидролиза смесью фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры [9].

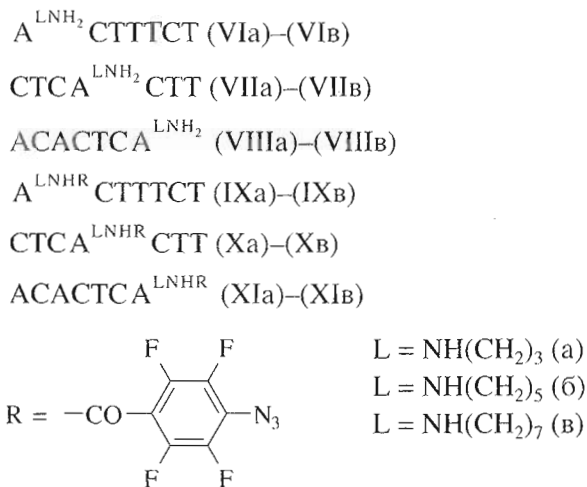
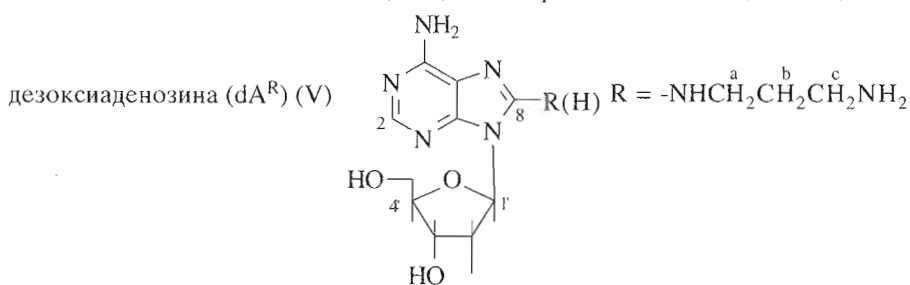


Таблица 1. Химические сдвиги (м. д.) в спектрах ¹H-ЯМР для дезоксиаденозина (dA) и 8-(3-аминопропил)амино-

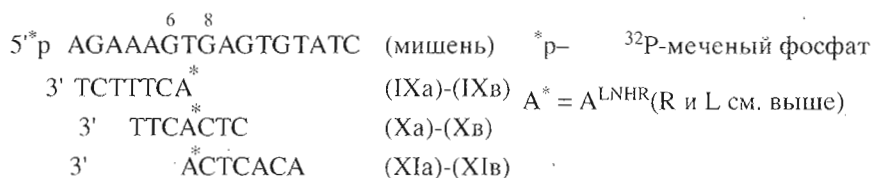


Нуклеозид	H2, с	H8, с	H1', т	H3', м	H4', м	H5', м	H2', м	CH ₂ ^a , т	CH ₂ ^b , м	CH ₂ ^c , т
dA	8.12	8.25	6.41	4.62	4.16	3.79	2.61	–	–	–
dA ^R	8.16	–	6.34	4.59	4.12	3.86	2.59	3.46	1.96	3.01

Ацилированием аминокрупп в составе полученных гелтануклеотидов с помощью *N*-оксисукцинимидного эфира 4-азидотетрафторбензойной кислоты [4] были получены конъюгаты (IX), (X) и (XI), содержащие фотоактивную группу. Все полученные соединения при обращенно-фазовой хроматографии элюируются буфером с более высокой концентрацией ацетонитрила по сравнению с соот-

ветствующим исходным аминоксодержащим олигонуклеотидом, что свидетельствует о присоединении гидрофобной группы. Выходы продуктов в реакции ацилирования 70–80%. На рис. 1 в качестве примера приведен профиль элюции соединения (IX).

Полученные реагенты (IX), (X) и (XI) были использованы для фотомодификации декануклеотида в комплементарных комплексах:



Олигонуклеотидные производные, модифицированные по 8-положению дезоксиаденозина, образуют менее стабильные комплексы с комплементарной цепью по сравнению с исходными олигонуклеотидами. Например, при введении аминокспейсера ($n = 7$) в олигонуклеотид

(5')ACTTTCT температура плавления комплекса соединения (VIb) с мишенью снижается с 24 до 16°C, а после введения фотоактивной группы (соединение (IXb)) – до 11°C. Модификацию ДНК-фрагмента проводили при 4°C, чтобы основная часть реагента находилась в дуплексе с мишенью.

Таблица 2. Фотомодификация мишени [^{32}P]pAGAAAGT-GAGTGTATC в присутствии реагента (IXa)

ω	$\delta_1, \%$	$\delta_2, \%$
2 : 1	26	–
5 : 1	30	–
10 : 1	42	–
100 : 1	43	17

Примечание. ω – соотношение реагент – мишень, δ_1 – выход ковалентных продуктов, δ_2 – выход дополнительных продуктов, имеющих меньшую электрофоретическую подвижность по сравнению с основными продуктами.

На примере реагента (IXa) было показано, что для фотомодификации олигонуклеотидной мишени оптимально соотношение реагент – мишень 10 : 1 (табл. 2); при стократном избытке реагента по сравнению с десятикратным избытком выход основных продуктов модификации практически не увеличивается, однако при этом появляются дополнительные продукты (возможно, из-за присоединения к мишени второй молекулы реагента). Дальнейшие эксперименты проводили с использованием десятикратного избытка реагентов.

Таблица 3. Фотомодификация мишени [^{32}P]pAGAAAGT-GAGTGTATC с помощью реагентов (IX)–(XI)

Реагент	$\delta_1, \%$	$\delta_3, \%$			$\delta_4, \%$
		G ⁶	T ⁷	G ⁸	
(IXa)	42	6	6	17	10
(IXб)	65	24	<5	19	11
(IXв)	49	12	9	11	15
(Xa)	29	7	<5	10	10
(Xб)	50	8	<5	32	8
(Xв)	38	10	7	9	15
(XIa)	48	13	9	20	13
(XIб)	56	20	11	6	9
(XIв)	35	12	13	<5	18

Примечание. δ_1 – выход ковалентных аддуктов (до обработки пиперидином), δ_3 – степень модификации по основаниям (после обработки пиперидином), δ_4 – количество щелочестабильных аддуктов (после обработки пиперидином).

В табл. 3 и на рис. 2 приведены результаты фотомодификации мишени реагентами (IX), (X), (XI), содержащими модифицированный дезоксиаденозин с различной длиной аминокспейсера в разных положениях олигонуклеотидной цепи. При облучении во всех случаях образуются продукты ковалентного присоединения реагента к мишени и иногда небольшое количество (5–10%) неидентифицированных продуктов, лишь слегка отличающихся по подвижности от исходной мишени (исходная мишень проявляется на электрофореграмме в виде одного пятна; данные не приведены). Ковалентные аддукты регистрируются в виде двух полос с близкой подвижностью. Возможно, они соответствуют продуктам присоединения реагента к разным основаниям мишени. Подобная зависимость электрофоретической подвижности аддуктов от места модификации реагента к мишени наблюдалась в работах [10, 11].

Максимальный выход продуктов модификации (50–65%) достигается при использовании реагентов (IXб), (Xб), (XIб), в которых фотоактивная группа введена через аминокспейсер с пентаметиленовым мостиком (табл. 3). При этом наиболее эффективным оказался реагент (IXб),

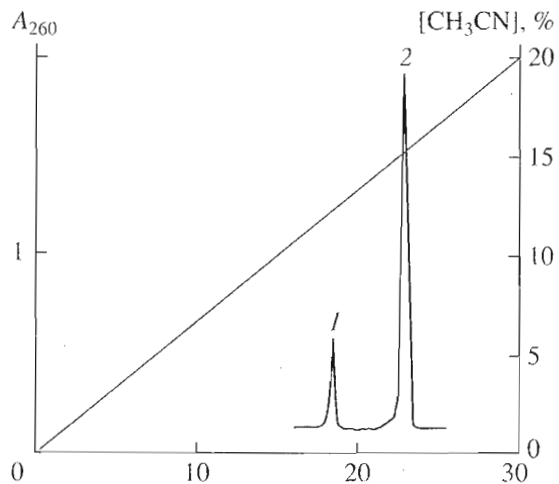


Рис. 1. Профиль обращенно-фазовой хроматографии при выделении олигонуклеотида (IXa) на LiChrosorb RP-18, колонка (2.4 × 250 мм), скорость элюции 2 мл/мин, градиент 0–20% ацетонитрила в 0.05 М LiClO₄: 1 – A^{NH(CH₂)₃NH₂}СТТТСТ (VIa), 2 – A^{NH(CH₂)_nNHR}СТТТСТ (IXa); R = –COC₆F₄N₃.

содержащий фотоактивную группу на 5'-концевом дезоксиаденозине. Степень модификации этим реагентом (65%) сравнима с эффективностью производных олигонуклеотидов, содержащих перфторарилазидную группу в 5-положении дезоксиуридина или на концевом фосфате [3].

Менее эффективными являются реагенты (Ха)–(Хв), содержащие фотоактивную группу в середине олигонуклеотидной цепи. Это, по-видимому, связано с тем, что реакционноспособная группа и модифицируемое основание находятся внутри дуплекса, что создает пространственное затруднение для реакции. Такая же тенденция наблюдалась в работе [3], когда фотоактивная группа была присоединена к остатку дезоксиуридина.

Для определения позиционной направленности фотомодификации была проведена пиперидиновая обработка реакционных смесей после облучения. Было обнаружено, что фотомодификация, приводящая к щелочеллабильным продуктам, затрагивает преимущественно основания G⁶, G⁸ и частично T⁷, пространственно близкие к реакционноспособной группе (рис. 2), что свидетельствует о

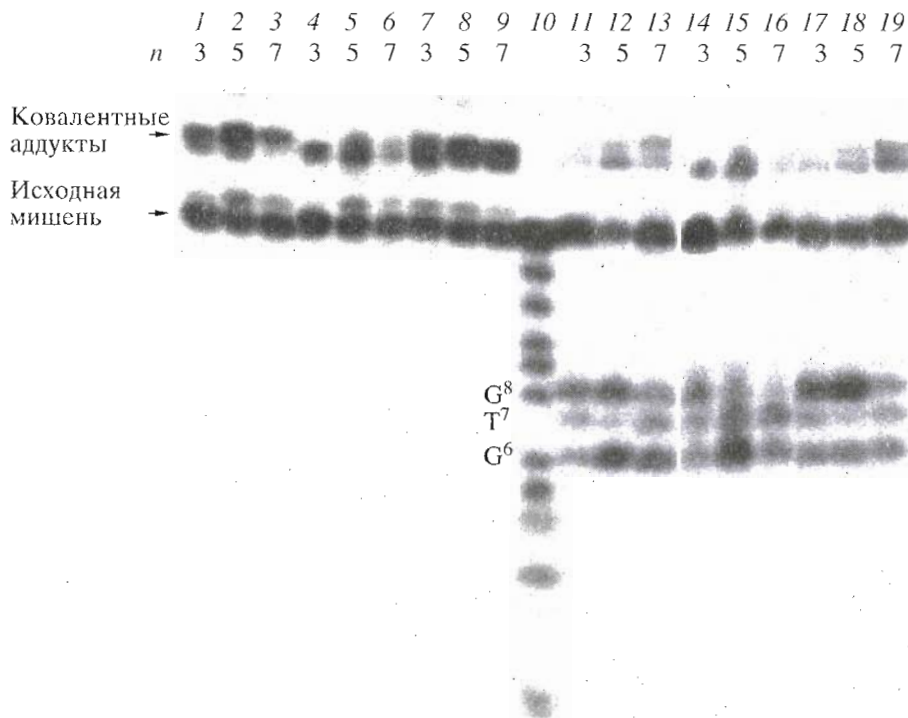


Рис. 2. Радиоавтограф геля, полученного при электрофоретическом анализе мишени [³²P]pAGAAAGTGAGTGTATC, подвергшейся облучению в присутствии реагентов (IX) (A^{NH(CH₂)_nNHR}СТТТСТ) (дорожки 1–3, 11–13), (X) (СТСА^{NH(CH₂)_nNHR}СТТ) (дорожки 4–6, 14–16) и (XI) (АСАСТСА^{NH(CH₂)_nNHR}) (дорожки 7–9, 17–19); реакционные смеси до обработки пиперидином (дорожки 1–9) и после такой обработки (дорожки 11–19); дорожка 10 – продукты расщепления олигонуклеотидной мишени по остаткам пуринов; n = 3, 5, 7 – число метиленовых групп в аминоспейсере. Концентрация мишени 1 × 10^{–6} М, реагентов – 1 × 10^{–5} М, температура 4°C; буфер 0.16 М NaCl, 0.02 М Na₂HPO₄, 0.1 мМ EDTA, pH 7.4. R как в подписи к рис. 1.

сайт-специфической модификации, хотя и не направленной точно на какое-либо одно основание.

Таким образом, новые олигодезоксирибонуклеотидные производные, содержащие перфторарилазидную группу в 8-положении дезоксиаденозина, расширяют класс перспективных фотоактивируемых реагентов для сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды синтезировали *H*-фосфонатным методом на полимере [12] в ручном варианте и выделяли ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией. ВЭЖХ олигонуклеотидов проводили на хроматографе Waters (США) на колонках (4,6 × 250 мм) с ионообменной смолой Полисил СА [13] в градиенте KH_2PO_4 (0–0.3 М, pH 6.5) в 30% ацетонитриле и с обращенно-фазовой смолой LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия) в градиенте концентраций ацетонитрила (0 → 20%) в 0.05 М растворе LiClO_4 ; скорость элюции 2 мл/мин. Олигонуклеотиды выделяли в виде литиевых солей осаждением из водного раствора в 2% раствор LiClO_4 в ацетоне.

УФ-спектры соединений регистрировали на спектрофотометре Specord UV-VIS (Германия). Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов при 260 нм (ϵ_{260}) рассчитывали по методу [14]. Для олигонуклеотидов, содержащих фотоактивную группу, ϵ_{260} принимали равным сумме значений ϵ_{260} для немодифицированного олигонуклеотида и величины $23300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для $\text{N}_3\text{C}_6\text{F}_4\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ [4].

Спектры ^1H - и ^{31}P -ЯМР (81.015 и 200.132 МГц соответственно) регистрировали на спектрометре WP-200 (Bruker, Германия). Для записи ^{31}P -ЯМР-спектров соединения растворяли в ацетонитриле (внешний стандарт – 85% H_3PO_4); ^1H -ЯМР-спектры записывали в D_2O (внутренний стандарт – тетраметилсилан).

Ферментативный гидролиз модифицированных гептануклеотидов (VI)–(VIII) проводили с помощью фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры (смесь ферментов любезно предоставлена В.И. Ямковым, Новосибирский госуниверситет) и гидролизат анализировали как описано в работе [9]. Показано, что при гидролизе олигонуклеотидов образуется смесь нуклеозидов С, Т, А и A^{LNH_2} ($\text{L} = -\text{NH}(\text{CH}_2)_n-$, $n = 3, 5, 7$); соотношения нуклеозидов совпадают с расчетными.

Соединения (IX)–(XI), содержащие 4-азидотетрафторбензоильную группу получали, как описано в работе [4].

Бромдезоксиаденозин (I) синтезировали в соответствии с [6].

***H*-Фосфонат 5'-*O*-диметокситритил-8-бромдезоксиаденозина (II)** получали по стандартной методике [7].

8-(3-Аминопропил)аминодезоксиаденозин (V) получен взаимодействием 8-бром-2'-дезоксиаденозина (I) (500 мг, 1.5 ммоль) с пропилендиамином (2 мл) в 10 мл пиридина при 80°C в течение 8–9 ч. Выход 67%. Соединение (V) охарактеризовано с помощью спектров УФ ($\lambda_{\text{max}} 280 \text{ nm}$, $\epsilon_{260} 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [5]) и ^1H -ЯМР (табл.1). Для производных дезоксиаденозина, содержащих в 8-положении аминоспейсер различной длины ($-\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$; $n = 3, 5, 7$), значение ϵ_{260} также принимали равным $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

***H*-Фосфонат 5'-*O*-диметокситритил-8-(3-аминопропил)аминодезоксиаденозина (IIIa)**. Соединение (IIIa) (1.35 г, 1.5 ммоль) растворили в 10 мл пиридина, добавили 2 мл пропилендиамина, выдерживали 8–9 ч при 80°C. Реакционную смесь анализировали с помощью ТСХ в системе $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} - 25\% \text{ NH}_3$ (9 : 1). Продукт, содержащий аминогруппу (проявление 0.2 % нингидрином в этаноле), выделяли гель-фильтрацией на LH-20, используя в качестве элюента смесь хлороформ – метанол (1 : 1). Выход 70%. Аналогично получали соединения (IIIб) и (IIIс).

***H*-Фосфонат 5'-*O*-диметокситритил-8-(3-трифторацетиламинопропил)аминодезоксиаденозина (IVa)**. Соединение (IIIa) (1 ммоль) несколько раз упарили с метанолом, растворили в 10 мл CH_3OH , добавили 2.5 мл $\text{CF}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ и 3 мл триэтиламина. Через 1.5–2 ч (50°C) реакционную смесь анализировали с помощью ТСХ в системе $\text{CHCl}_3 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (7 : 3). Продукт с большей подвижностью, по сравнению с исходным соединением, выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте метанола в хлороформе (0–40%). Выход 90%. В ^{31}P -ЯМР-спектре соединения (IVa) зарегистрирован сигнал с $\delta 2.4$ м.д. и $J_{\text{P,H}} 607$ Гц. Аналогично получали соединения (IVб) и (IVс).

Фотомодификация гексадекануклеотида. Реакционную смесь (20 мкл), содержащую мишень [^{32}P]pAGAAAGTGAGTGTATC в концентрации 1×10^{-6} М и один из фотореагентов (X) – (XII) в концентрации 1×10^{-5} М в буфере pH 7.4 (0.16 М NaCl, 0.02 М Na_2HPO_4 , 0.1 мМ EDTA), помещали в 1-мм кварцевую кювету, охлаждали до 4°C и облучали фильтрованным светом ртутной лампы ДРК-120 с расстояния 20 см. Для облучения использовали набор стеклянных фильтров БС-12, УФС-1 (303–365 нм). Источник света ОИ-18А “ЛОМО”, мощность 5×10^{-4} Вт/см². Время экспозиции 5 мин.

Анализ продуктов фотомодификации. После облучения реакционную смесь делили на две равные части, одну из которых обрабатывали 10% водным пиперидином (30 мин, 95°C). Оба раствора осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне и анали-

зировали с помощью гель-электрофореза в 20% полиакриламидном геле (8 М мочевины, 0.05 М Трис-борат, 1 мМ EDTA, pH 8.3). Денситометрические профили дорожек радиоавтографа получали, используя лазерный сканер (LKB Ultroskan XL, Швеция). Выход определяли по формуле $[I_i/\Sigma I_i] \times 100\%$, где I_i – площади пиков, соответствующих продуктам фотомодификации, ΣI_i – площади всех пиков денситограммы в соответствующей дорожке радиоавтографа. Степень модификации после обработки пиперидином определяли по формуле $[(\Sigma I_i - I_m)/\Sigma I_i] \times 100\%$, где I_m – площадь пика, соответствующего непрореагировавшей мишени и ΣI_i – суммарная площадь всех пиков денситограммы в соответствующей дорожке радиоавтографа. Результаты приведены в табл. 2 и 3.

Работа финансировалась грантом Государственной программы “Новейшие методы бионженерии” и грантом РФФИ № 96-04-50191.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helene C., Le Doan T., Thuong N.T. Photochemical Probes in Biochemistry / Ed. P.E. Nielson. Kluwer Academic Publishers, 1989. P. 219–229.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. // Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokio: CRC Press, 1994.
3. Levina A.S., Tabatadze D.R., Dobrikov M.I., Shishkin G.V., Khalinskaya L.M., Zarytova V.F. // Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 1996. V. 6. P. 119–126.
4. Levina A.S., Tabatadze D.R., Khalinskaya L.M., Pritchodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova L.A., Zarytova V.F. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 319–325.
5. Репкова М.Н., Иванова Е.М., Филиппов Р.В., Веньямина А.Г. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 432–440.
6. Ikehara M., Kaneko M. // Tetrahedron. 1970. V. 26. P. 4251–4259.
7. Garegg P.J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Chem. Scripta. 1986. V. 26. P. 59–62.
8. Garegg P.J., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Nucleosides Nucleotides. 1987. V. 6. P. 655–662.
9. Веньямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.
10. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Лохов С.Г. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 30–39.
11. Ошевский С.И. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 387–391.
12. Froehler B.C., Ng P.G., Matteucci M.D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 5399–5407.
13. Ястребов С.И. Способ получения сорбента: А. с. СССР 1153976 // Б. И. 1985. № 17. С. 28.
14. Borer P.N. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. V. 1 / Ed. G.D. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. P. 589.

Synthesis of Oligodeoxyribonucleotide Derivatives Containing a Perfluoroazide Group at the C8 Atom of Deoxyadenosine and Their Use in the Photomodification of DNA Fragments

A. S. Levina[#], T. V. Vasil'eva, and V. F. Zarytova

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

Heptadeoxynucleotides were obtained that contained an aliphatic amino group in position 8 of the deoxyadenosine residue: A^{LNH₂}CTTTCT, CTCA^{LNH₂}CTT, and ACASTCA^{LNH₂} where L = NH(CH₂)_n, n = 3, 5, or 7. A 4-azidotetrafluorobenzoyl residue was attached to the amino group in the oligonucleotides, and photomodification of a DNA target by the resulting reagents was carried out. It was shown that the length of the spacer influences the photomodification extent of the target; a spacer with n = 5 is optimum. The maximum modification extent (65%) was reached when a reagent containing a photoreactive group at the 5'-terminal deoxyadenosine residue was used.

Key words: oligonucleotides, photoreactive derivatives; DNA, photomodification; deoxyadenosine, 8-substituted

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: Levina@niboch.nsc.ru; phone: +7 (3832) 39-6275.