



УДК 547.963.32.057 + 577.113 + 535.371

© 1990 г.†

*В. Ф. Зарытова, И. В. Кутявин, Т. В. Мальцева  
С. В. Мамаев, В. П. Мальцев \**

### ФОТОМОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ N-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИИДЕВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР;  
\* Новосибирский институт кинетики и горения СО АН СССР*

Исследована реакция фотомодификации 302-членного одноцепочечного фрагмента ДНК 5'-моно- и 3',5'-ди-N-(2-гидроксиэтил)феназиниевыми (Phn) производными олигонуклеотидов. Показано, что при интенсивном лазерном облучении ( $\lambda$  532 нм, плотность мощности 2,5 ГВт/см<sup>2</sup>, доза облучения 30 Дж) фрагмент ДНК в присутствии Phn-реагентов подвергается значительной деструкции, достигающей 70–95%. При этом уровень комплементарно адресованной модификации составляет 24–51% и находится в прямой зависимости от длины олигонуклеотидного адреса фотореагента и количества в нем остатков Phn, стабилизирующих комплементарный комплекс. Характер неадресованной модификации близок к статистическому, хотя для ряда фотореагентов была зарегистрирована весьма эффективная неспецифическая модификация 5'-концевой последовательности ДНК-мишени. Отмечается также необычайно широкая позиционная направленность фотомодификации фрагмента ДНК в области полного комплементарного связывания 5'-Phn-реагентов.

В последнее время полиароматические гетероциклические системы находят все большее применение в развитии новых вариантов метода комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот. В основном они используются для повышения эффективности действия адресованных олигонуклеотидных реагентов [1–3] вследствие стабилизации образуемых ими комплементарных комплексов [3–6] и для направленной фотомодификации НК [7–9]. Перспективными могут оказаться такие типы ароматических радикалов, которые в структуре олигонуклеотидных производных выполняли бы одновременно как стабилизирующую, так и модифицирующую функцию.

Ранее нами было показано [3, 6], что остаток Phn, ковалентно присоединенный к 5'-концу олигонуклеотида, значительно повышает стабильность его комплекса с комплементарной последовательностью. Это в свою очередь обеспечивает существенное повышение эффективности действия алкилирующих олигонуклеотидных реагентов [2, 3].

Настоящая работа посвящена изучению возможности использования Phn-производных олигонуклеотидов как фотоактивируемых реагентов для модификации НК.

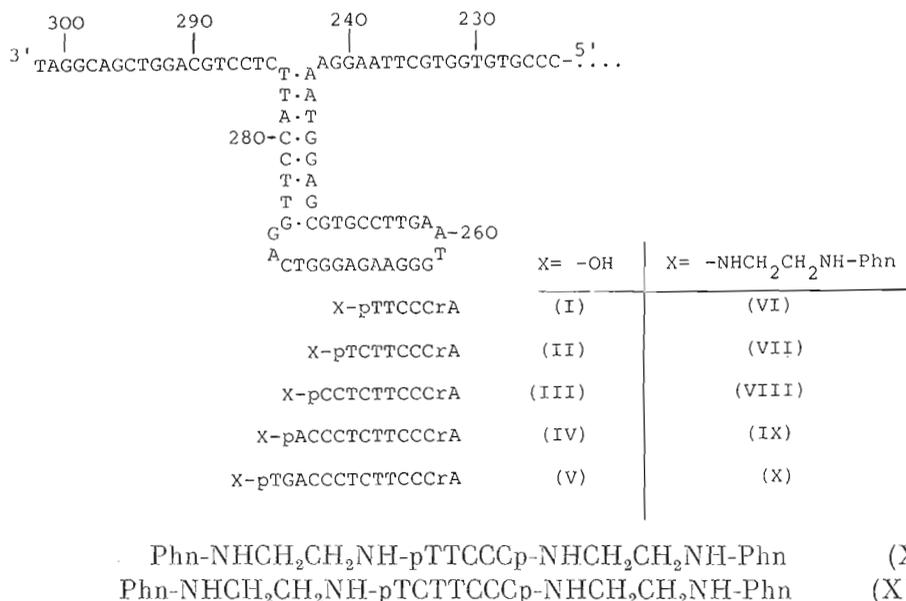
В качестве НК-мишени в работе был использован <sup>32</sup>P-меченый 302-членный одноцепочечный фрагмент ДНК, являющийся копией фрагмента РНК вируса клещевого энцефалита [3]. Эта нуклеотидная последовательность может образовывать несколько шпильчатых структур [10], одна из которых приведена на схеме 1. Для фотомодификации этой нуклеотидной мишени были синтезированы олигонуклеотиды (I)–(V) и получены их 5'-Phn-производные (VI)–(X), а также пента- и гептануклеотиды с 3',5'-ди-

Сокращения: Phn — остаток N-(2-гидроксиэтил)феназина, НК — нуклеиновые кислоты; символ d в аббревиатуре нуклеотидов опущен; rA — рибоадениозин.

Phn-фотореагенты (XI), (XII), имеющие с соединениями (VI)—(X) общий сайт комплементарного связывания на матрице (схема 1).

Для селективной фотоактивации остатка красителя в присутствии НК обычно используется интенсивное лазерное излучение с  $\lambda$  330 нм [7—9].

Схема 1



Применяемые нами 2-алкиламино-10-(2-гидроксиэтил)феназиновые красители практически не поглощают свет при 330 нм — эта длина волны соответствует локальному минимуму в их электронных спектрах. Максимумы поглощения наблюдаются лишь в более длинноволновой области при 400 и 530 нм ( $\epsilon$   $10 \cdot 10^3$  и  $16 \cdot 10^3$  M<sup>-1</sup>/см соответственно) [6]. Данное обстоятельство определило выбор источника излучения в настоящей работе, и реакцию фотомодификации проводили, облучая водно-солевой раствор фрагмента ДНК в присутствии фотореагентов (VI)—(XIII) видимым светом с  $\lambda$  532 нм.

При адресованной фотомодификации наряду с непосредственным разрывом цепи НК отмечается образование продуктов ковалентной сшивки между фотореагентом и полинуклеотидной мишенью [9]. Основная часть такого рода аддуктов в щелочных условиях подвергается деструкции с разрывом цепи НК-мишени. Учитывая это обстоятельство, в данной работе перед проведением электрофоретического анализа реакционные смеси после их облучения подвергали обработке водным пиперидином. Фотомодификацию обнаруживали по соответствующим продуктам деструкции ДНК\*.

Результаты электрофоретического анализа реакционных смесей после облучения указывают на сайтспецифический характер модификации фрагмента ДНК реагентами (VIII)—(XIII) (рис. 1, дорожки 4—8 соответственно). На радиоавтографе геля визуально регистрируются <sup>32</sup>P-меченые продукты расщепления полинуклеотидной цепи по основаниям петлевого участка, ближайшего к 3'-концу ДНК-мишени (см. схему 1), т. е. в той же области, куда фотореагенты (VI)—(XII) непосредственно были направлены. При облучении мишени в присутствии свободного красителя, не связанного с олигонуклеотидом, ДНК-фрагмент подвергается практически количественному разрушению. В этом случае регистрируются продукты

\* Продуктов фотосшивки мишень-реагент, устойчивых в условиях щелочной обработки, в работе не наблюдали, и термины «модификация», «деструкция» далее употребляются как синонимы.

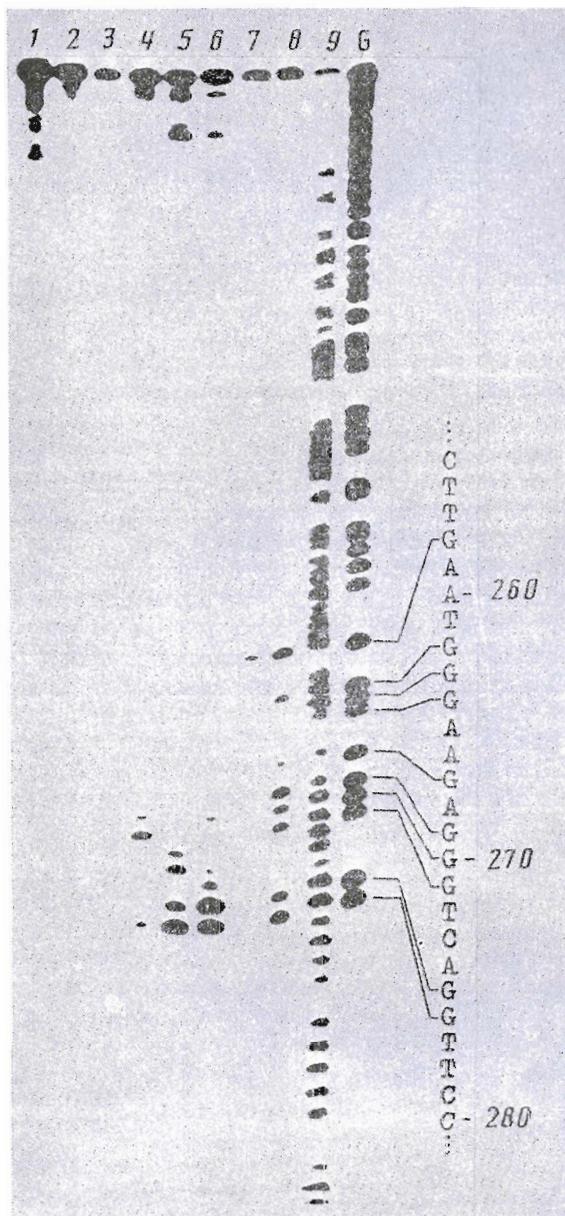


Рис. 1. Радиоавтограф геля, полученный при электрофоретическом анализе препаратов фрагмента ДНК, подвергшихся облучению в отсутствие (1) и в присутствии Phn-реагентов (VI)—(XII) (2—8 соответственно) или хлорида 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-гидроксиэтил)феназина (9). Дорожка G — продукты расщепления полинуклеотидной цепи мишени по остаткам гуанина. Перед проведением фотомодификации реакционные смеси содержали фрагмент ДНК в концентрации  $1 \cdot 10^{-8}$  М, фотоактивные соединения —  $5 \cdot 10^{-5}$  М в 0,16 М NaCl, 0,02 М  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 0,1 мМ EDTA (рН 7,4)

расщепления полинуклеотидной цепи практически по всем основаниям и характер деструкции близок к статистическому, хотя можно выделить преимущественную модификацию гуаниловых остатков (рис. 1, 9). Следует также отметить устойчивость фрагмента ДНК в условиях фотомодификации, проведенной в отсутствие каких-либо фотореагентов. Наблюдается лишь некоторая статистическая деструкция ДНК (рис. 1, 1), которая, по данным серии экспериментов, является следствием обработки 10% водным пиперидином. Уровень этой неспецифической деструкции ДНК-мишени вычитали при расчетах эффективности фотомодификации.



Данные по эффективности и селективности деструкции фрагмента ДНК фотореагентами (VI) – (XII)

Фотореагент	Общий уровень деструкции ДНК	Уровень неадресованной деструкции	Уровень адресованной деструкции
	%		
(VI)	70	46	24
(VII)	80	51	29
(VIII)	80	44	36
(IX)	87	51	36
(X)	89	42	47
(XI)	94	54	40
(XII)	95	44	51

ствующим рядом 5'-моно-Phn-производных (VI)–(X) при существенно большей длине нуклеотидного адреса последних. Следует отметить, что уровень неадресованной (или неспецифической) деструкции в опытах изменялся незначительно (от 42 до 54%) и какой-либо зависимости его от структуры фотореагентов установить не удалось. В основном неспецифическая деструкция носит статистический характер. Некоторая позиционная направленность, как уже отмечалось, регистрировалась лишь в случае соединений (VIII)–(X). Отсутствие существенных различий по уровню неадресованной фотомодификации фрагмента ДНК в ряду реагентов (VI)–(XII), вероятно, связано с особенностью механизма этого процесса, при реализации которого, например, структура олигонуклеотидного адреса не имеет решающего значения.

Неожиданным результатом, полученным в настоящей работе, явилась необычно широкая позиционная направленность действия Phn-реагентов в районе петлевого участка фрагмента ДНК, ближайшего к 3'-концу цепи (схема 1). Так, в ряде случаев (см. рис. 1, 4–6, 8) деструкция НК-мишени регистрируется одновременно по нескольким достаточно удаленным друг от друга основаниям. Более детальная картина модификации полинуклеотидной мишени между остатками C<sup>255</sup> и C<sup>280</sup> была получена при денситометрии соответствующих дорожек радиоавтографа (рис. 2). Это позволило, например, выявить элементы адресованной деструкции даже в случае самых низкоэффективных фотореагентов (VI) и (VII) (рис. 2, ср. профили 2, 3 с 1).

Объяснить размах позиционной направленности действия 5'-Phn-реагентов только с точки зрения теоретических моделей механизма фотомодификации [12, 13] и опыта предыдущих работ [7–9] не представлялось возможным.

Наблюдаемый феномен, вероятно, следствие особенности вторичной структуры фрагмента ДНК в области адресованной деструкции.

Логично предположить, например, что основания C<sup>275</sup> и C<sup>276</sup> полинуклеотидной мишени задействованы в формировании определенного «стекпинг-кармана», прочно связывающего остаток Phn. В пользу этого свидетельствует тот факт, что продукты деструкции фрагмента ДНК по этим двум основаниям обнаруживаются практически во всех опытах (рис. 2). При этом относительная эффективность фотомодификации по C<sup>275</sup> и C<sup>276</sup> возрастает с увеличением длины олигонуклеотидного адреса в реагентах (VI)–(X), т. е. по мере их пространственного сближения с ковалентно связанным 5'-Phn-остатком.

Наличие в фотореагентах (XI) и (XII) в сравнении с соединениями (VI)–(X) второго остатка Phn на 3'-конце цепи практически не расширяет спектр продуктов адресованной деструкции ДНК-мишени.

Если указанное структурное изменение 3'-концевой части фотореагента оказывает большое влияние на его эффективность (ср. структуру и эффективность действия реагентов (VI), (VII) и (XI), (XII), схема 1, таблица), то связанный с этим прирост в полиморфизме продуктов адресованной деструкции ДНК-мишени следует признать весьма незначительным.

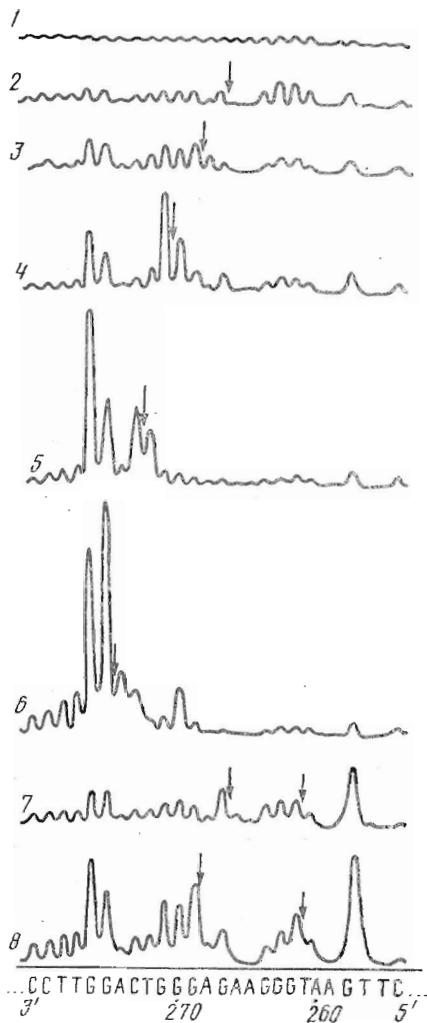


Рис. 2. Денситометрические профили, полученные при сканировании дорожек радиоавтографа (см. рис. 1) в области продуктов адресованной деструкции фрагмента ДНК. Все профили сбалансированы между собой по суммарной радиоактивности в дорожках геля и приведены в относительных единицах поглощения. Их номера соответствуют номерам дорожек радиоавтографа (рис. 1). Стрелками указана граница сайта комплементарного связывания соответствующего фотореагента или место предполагаемого расположения остатка Phn в комплексе

В заключение следует отметить определенный недостаток использованной нами методики облучения реакционных смесей — неконтролируемость температурного режима реакции фотомодификации в процессе облучения. Вследствие очень высокой мощности лазерного излучения ( $2,5 \text{ ГВт/см}^2$ ) нельзя исключить возможность перехода части световой энергии в тепловую, а следовательно, и повышения температуры реакционной смеси в процессе фотоактивации реагентов. Данное обстоятельство могло отразиться в основном на характеристиках эффективности действия фотореагентов (таблица). Тем не менее облучение всех реакционных смесей приводили в стандартных условиях: объем раствора и его исходная температура ( $23^\circ \text{C}$ ), расположение фокуса луча в кювете, мощность и доза облучения и т. д. Поэтому проведенную сравнительную характеристику

Это хорошо видно при сравнении денситометрических профилей 3 и 8 (рис. 2), полученных при испытании сходных по структуре фотореагентов (VII) и (XII). В случае соединения (XII) регистрируется лишь относительно более интенсивная деструкция фрагмента ДНК по основанию  $\text{G}^{258}$ . Характерно, что именно это основание подвергается алкилированию 2,3'-O-[4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензилиденовыми производными олигонуклеотидов (I)–(V)] [3, 10, 11]. Таким образом, можно констатировать совершенно различное участие 5'-Phn- и 3'-Phn-остатков в формировании позиционной направленности действия фотореагентов (VI)–(XII).

Все изложенные выше экспериментальные данные свидетельствуют о том, что Phn-производные олигонуклеотидов могут быть успешно использованы для адресованной фотомодификации НК. Весьма перспективны в этом отношении фотореагенты, содержащие в своей структуре одновременно два остатка Phn. Эти соединения отличаются высокой эффективностью действия даже в случае сравнительно небольшого олигонуклеотидного адреса. Широкая позиционная направленность адресованной модификации, обнаруженная для данного класса фотореагентов, может ограничить их применение в области химического расщепления НК, но не при решении задач селективного подавления функциональной активности полинуклеотидов в живых клетках. Надеемся, что дальнейшее исследование комплементарно адресованной фотомодификации НК Phn-производными олигонуклеотидов, включая детальное изучение механизма этого процесса, позволит решить проблемы, возникшие при интерпретации ряда интересных результатов данной работы.

Phn-реагентов и выводы, сделанные на базе полученных экспериментальных данных, следует считать корректными. В дальнейшем для устранения указанного недостатка предполагается усовершенствовать процедуру облучения реакционных смесей.

### Экспериментальная часть

Первичная структура фрагмента ДНК, использованного в работе в качестве мишени, методика его получения и введения  $^{32}\text{P}$ -метки на 3'-конец цепи приведены в работе [3]. В синтезе всех фотоактивных реагентов (VI)—(XII) использовали олигонуклеотиды (I)—(V), полученные ранее [3, 11]. Введение Phn-остатка по 5'-концевой фосфатной группе в случае синтеза соединений (VI)—(X) осуществляли по методу [6]. Окислением 3'-концевого рибонуклеозида периодатом натрия [14] из олигонуклеотидов (I) и (II) были получены соответственно пента- и гептануклеотид, содержащие две 3'- и 5'-концевые фосфатные группы. Без внесения каких-либо изменений в методику [6] далее были синтезированы с выходом 40—50% их 3', 5'-ди-Phn-производные: (XI) и (XII). При идентификации Phn-реагентов применяли стандартный набор [6] физико-химических методов.

Реакцию фотомодификации проводили, облучая водно-солевой раствор (2,3 мкл)  $^{32}\text{P}$ -меченого фрагмента ДНК и соответствующего Phn-производного олигонуклеотида 2-й гармоникой  $\text{Nd}^+$ : YAG-лазера с  $\lambda$  532 нм. Излучение фокусировалось в цилиндрическую стеклянную кювету (диаметр 1 мм) с торцевым зеркальным покрытием. При этом диаметр луча, проходящего через центр кюветы, в среднем был равен 100 мкм. Общая доза облучения каждой пробы составляла 30 Дж при плотности мощности лазерного излучения 2,5 ГВт/см<sup>2</sup>. После облучения препараты ДНК обрабатывали 10% водным пиперидином [9] (30 мин, 100° С) и анализировали с помощью электрофореза (рис. 1) в 8% полиакриламидном геле (8 М мочевины, 0,05 М трис-борат, рН 8,0).

Степень деструкции (или модификации) ДНК рассчитывали, исходя из данных распределения  $^{32}\text{P}$ -метки в дорожках геля. При этом из геля вырезали участки, содержащие фрагмент ДНК, не подвергшийся деструкции, и участки с продуктами его распада, разбивая каждую дорожку на 14 приблизительно равных сегментов. Радиоактивность их определяли в в толуольном сцинтилляторе, используя счетчик Mark III (Nuclear Chicago, США). Уровень модификации ДНК (таблица) определяли как отношение радиоактивности соответствующих участков геля к общей радиоактивности в дорожке. Адресованной полагали модификацию фрагмента ДНК по основаниям между  $\text{C}^{255}$  и  $\text{C}^{280}$  включительно. Денситометрические профили дорожек радиоавтографа (рис. 2) получали, используя лазерный сканер LKB Ultroskan XL (Швеция).

Для определения положения оснований, подвергшихся модификации, проводили частичное расщепление фрагмента по гуанинам [15]. Полученные таким образом продукты расщепления наносили на гель в качестве контрольной дорожки (дорожка G, рис. 1).

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленисакриламид, dNTP (Serva, ФРГ). Хлорид 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-гидроксиэтил)-феназиния был получен и охарактеризован ранее [6]. Остальные реактивы были квалификации х. ч. или ос. ч.

Авторы выражают глубокую признательность Л. М. Подуст за помощь, оказанную в работе.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeirial A., Thuong N. T., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 23. P. 9909—9919.
2. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1220.
3. Vlassov V. V., Zarytova V. F., Kutiavin I. V., Mamaev S. V., Podymingogin M. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 10. P. 4065—4076.

4. Asseline V., Toulme F., Thuong N. T., Delarue M., Montenay-Carestier T., Helene C. // EMBO J. 1984. V. 3. № 4. P. 795—800.
5. Letsinger R., Schott M. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 24. P. 7394—7396.
6. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. И., Шишкин Г. В. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
7. Benimetskaya L. Z., Bulychew N. V., Kozionov A. L., Lebedev A. V., Nesterikhin Y. E., Novozhilov S. Y., Rautian S. G., Stockman M. I. // FEBS Lett. 1983. V. 163. № 1. P. 144—149.
8. Бенимецкая Л. З., Бульчев Н. В., Козионов А. Л., Лебедев А. В., Нестерихин Ю. Е., Новозhilов С. Ю., Раутиан С. Г., Штокман М. И. // Биооргани. химия. 1984. Т. 9. № 4. С. 144—149.
9. Бенимецкая Л. З., Бульчев Н. В., Козионов А. Л., Кошкин А. А., Лебедев А. В., Новозhilов С. Ю., Штокман М. И. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 48—57.
10. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Мамаяев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221—1229.
11. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаяев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогов М. А. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240—248.
12. Andreoni A., Cibeddu R., DeSilvestri S., Laporta P., Svelto O. // Phys. Rev. Lett. 1980. V. 45. P. 431.
13. Пархоменко А. Н., Раутиан С. Г., Штокман М. И. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 250. № 1. С. 225.
14. Орещкая Т. С., Крылецкая Н. Ф., Романова Е. А. // Химия природных соединений. 1987. № 5. С. 731—734.
15. Mazam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.

Поступила в редакцию  
22.V.1989

V. F. ZARYTOVA, I. V. KUTYAVIN, T. V. MALTSEVA,  
S. V. MAMAIEV, V. P. MALTSEV \*

PHOTOMODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS  
BY N-(2-OXYETHYL)PHENAZINE DERIVATIVES  
OF OLIGONUCLEOTIDES

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR:  
\*Novosibirsk Institute of Chemical Kinetics and Combustion,  
Siberian Division of the Academy of the USSR*

Photomodification of a 302-membered single-stranded DNA fragment by 5'-mono- and 3',5'-di-N-(2-oxyethyl)phenazine (Phn) derivatives of oligonucleotides has been investigated. Under strong laser irradiation ( $\lambda$  532 nm; power density 2.5 GV/cm<sup>2</sup>, irradiation dose 30 J) the DNA fragment in the presence of Phn-reagents was significantly destructed (up to 70—95%). The level of complementary addressed modification (24—51%) is a direct function of the length of oligonucleotide address of the photoreagent and the amount of Phn residues, stabilizing the complementary complex. The character of the nonaddressed modification is close to the statistic one, although for a number of photoreagents a rather efficient nonspecific modification of 5'-terminal sequence of target DNA has been detected. Of interest also is an unusually broad positional direction of the DNA fragment photomodification in the area of perfect complementary coupling of 5'-Phn-reagents.