



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 18 * № 4 * 1992

УДК 547.963.32.07:577.413.6:554

© 1992 г. *М. И. Добринов, В. Ф. Зарытова, Н. И. Комарова^{*},
А. С. Левина, С. А. Лохов, Т. А. Приходько,
Г. В. Шишкун, Д. Р. Табатадзе*, М. М. Заалишвили**

ЭФФЕКТИВНАЯ КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АРОМАТИЧЕСКУЮ АЗИДОГРУППУ

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск;

** Институт молекулярной биологии и биофизики АН Грузии, Тбилиси*

Впервые осуществлена высокоеффективная сайт-специфическая фотомодификация ДНК-мишени олигонуклеотидными реагентами, несущими ароматическую азидогруппу. Получены производные олигонуклеотидов, содержащие группировки, имеющие в составе фотоактивные радикалы R ($R^1=n$ -азидотетрафторбензоил, $R^2=5$ -азидо-2-нитробензоил, $R^3=n$ -азидобензоил) на 5'-конце или фосфате $R^1NH(CH_2)_3NHpd(TCCACTT)$ и при C5-атоме дезоксиуридина d($U^{LNH}CCACTT$), где $LNH=-CH_2NH-$, $-CH_2OCH_2CH_2NH-$, $-CH_2NHCOCH_2CH_2NH-$. Показано, что полученные производные способны образовывать стабильные комплементарные комплексы и осуществлять сайт-специфическую фотомодификацию ДНК-мишени. На примере модификации пентадекануклеотида d(TAAGTGAGTTGGC) полученными реагентами показано, что предельная степень фотомодификации существенно зависит от типа используемого арилазида. Выявлено значительное преимущество перфторированного ароматического азида (R^1) в качестве фотопротектора. В случае группировки R^1 показано, что степень модификации практически не зависит от места присоединения реагента и достигает 65–70% во всех случаях, кроме $LNH=-CH_2NH-$, когда мишень модифицируется в 2 раза слабее. Определена позиционная направленность модификации для олигонуклеотидных реагентов, содержащих радикал R^1 . В случае $L=-CH_2-OCH_2CH_2-$, а также когда фотоактивная группа присоединена к концевому фосфату, происходит селективная модификация мишени по одному основанию G⁹.

Олигонуклеотиды с присоединенными фотоактивируемыми группами являются перспективными реагентами для сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот. Они обладают высокой эффективностью и способны вступать в реакции только при облучении светом, причем в зависимости от природы реагента можно варьировать длину волны излучения.

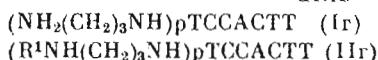
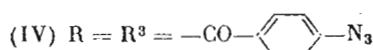
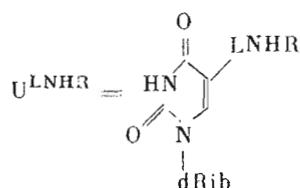
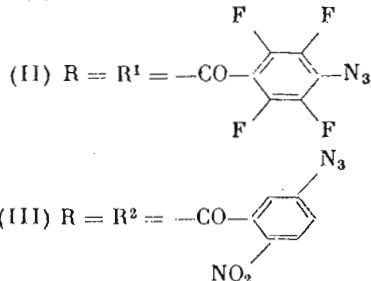
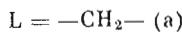
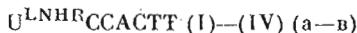
Наиболее эффективными из описанных в литературе фотопротекторов оказались олигонуклеотиды, содержащие остатки псоралена [1, 2] или этидия [3]; в этом случае степень модификации олигонуклеотидной мишени достигала 80%. Однако вследствие низкого квантового выхода модификации для этих реагентов ($\phi=10^{-2}-10^{-4}$ для псоралена [2] и $\phi<10^{-8}$ для этидия [3]) требуется длительное время и высокая мощность облучения. Представляют интерес фотопротекторы на основе ароматических азидов, которые обладают высоким квантовым выходом фотомодификации.

Префикс «d» в написании олигонуклеотидов для простоты опущен, так как в работе использованы только нуклеотиды дезоксирибонуклеиновой кислоты.

($\phi=0,3-0,5$) [4], кроме того, в силу достаточно простых методов получения этих реагентов имеется возможность варьирования их структуры и, тем самым, спектральных свойств. Описанные в литературе реагенты, содержащие ароматические азидогруппы, например *n*-азидофенацильные [5], оказались недостаточно эффективными, по-видимому, из-за неблагоприятного влияния фенацильной группы на фотохимические свойства азидогруппы. Известно, что введение акцепторных заместителей ($-\text{COOR}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$) в *n*-положение к азидогруппе благоприятно скаживается на ее фотохимических свойствах [6]; введение атомов фтора в ароматическое кольцо увеличивает выход продуктов внедрения в мишень при фотолизе [5, 7].

В настоящей работе получены и сопоставлены по эффективности воздействия в комплементарном комплексе олигонуклеотиды, содержащие *n*-азидо-, *n*-азидотетрафтор- и 5-азидо-2-нитробензамидные группы.

Олигонуклеотиды, содержащие алифатическую аминогруппу в 5-положении остатка дезоксиуридуна (I), получали как описано в работе [8]. Кроме того, был получен гентануклеотид (I_Г), содержащий аминогруппу в группировке, присоединенной к 5'-коицевому фосфату [9]. Ацилированием аминогрупп в составе гентануклеотидов с помощью N-оксисукцинимидных эфиров соответствующих азидобензойных кислот были получены соединения (Ia—г), (III_в), (IV_в), выделенные обращенно-фазовой хроматографией. Продукт (IV_в), профиль элюции которого приведен для примера (рис. 1), элюируется при более высокой концентрации ацетонитрила по сравнению с исходным аминосодержащим олигонуклеотидом, что свидетельствует о присоединении гидрофобной группы. Выходы продуктов в реакции ацилирования 70–80 %.



Состав соединений (I_б, в), содержащих спейсер с аминогруппой, и соединений с ароматической азидогруппой (Ia—в) был подтвержден ферментативным гидролизом (фосфодиэстераза и 5'-нуклеотидаза из яда кобры) [10]. Количественные данные результатов гидролиза приведены в табл. 1. Модификация олигонуклеотидов не только не приводит к destabilизации дуплексов, но даже несколько увеличивает их температуру

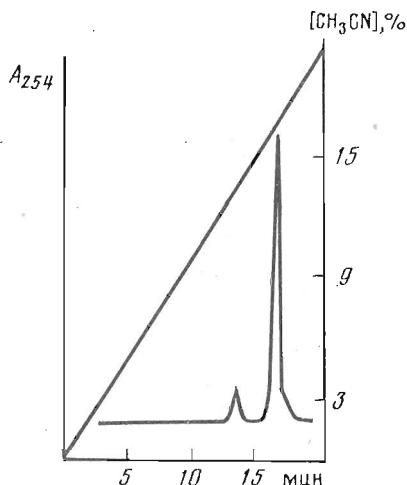


Рис. 1. ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе $U^{LNHR}CCA\cdot CTT$ (IIв), $L = -CH_2NH\cdot COCH_2CH_2-$ на Lichrosorb, RP18 (Merck, ФРГ); колонка 4,6 × 250 им, градиент концентрации ацетонитрила в 0,05 M $LiClO_4$, скорость элюции 2 мл/мин

плавления (табл. 2). Это дает основание использовать полученные производные для комплементарно адресованной фотомодификации нуклеиновых кислот.

В качестве мишени был взят ^{32}P -меченный пентадекануклеотид $^{32}pTAA GTGGAG TTTGCG$, имеющий участок, комплементарный синтезированному гептануклеотиду. Фотоактивацию ароматического азига проводили фильтрованным светом ртутной лампы ДРК-120 при длинах волн 303–365 нм. В этой области используемые ароматические азигы имеют хотя и слабое, но достаточное для возбуждения поглощение. Фотомодификацию олигонуклеотида проводили в течение 3–5 мин. Реакционные смеси после облучения анализировали с помощью гель-электрофореза.

На рис. 2 приведен радиоавтограф геля, полученный при анализе меченой матрицы, подвергшейся облучению в присутствии немодифицированного гептануклеотида TCCACTT (V), реагента (IIв), некомплементарного гексануклеотида $U^{LNHR}CCCC$ (L и R как в (IIв)), N-оксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты, а также в отсутствие всяких реагентов. Видно, что специфическая модификация мишени происходит только в присутствии комплементарного олигонуклеотидного реагента (IIв); при этом образуются продукты ковалентного связывания реагент-мишень с меньшей, чем у исходного пентадекануклеотида, подвижностью (дорожка 3). Обработка реакционной смеси пиперидином после облучения приводит к разрыву мишени по фрагменту с модифицированными основаниями; при этом обнаруживается преимущественная модификация оснований G⁷ и G⁹, находящихся вблизи фотоактивной группировки (дорожка 7). Что касается контрольных экспериментов, то во всех случаях в небольшой степени происходит скрытая модификация мишени, которая проявляется только после обработки облученного образца пиперидином (дорожки 6, 8–10). Степень деградации мишени в отсутствие всяких реагентов составила 20%, в присутствии комплементарного немодифицированного гептануклеотида она уменьшается до 8–10%.

Были проведены эксперименты по фотомодификации мишени реагентом (IIв) при 22 и 4°C; варьировались также избытки реагента по отношению к олигонуклеотидной матрице. Степень модификации рассчитывали исходя из результатов экспериментов, в которых реакционные смеси не подвергались обработке пиперидином, по распределению ^{32}P -метки в дорожках геля или по денситометрическим профилям дорожек радиоавтографа (табл. 3).

Таблица 1

Мольные соотношения нуклеозидов по данным обращенно-фазовой хроматографии гидролизатов олигонуклеотидов ХССАСТТ (I), (III), (VI) (фосфодиэтераза и 5'-нуклеотидаза из яда кобры)*

X	Реагент	C	X	T	A
U ^{CH₂OCH₂CH₂NH₂}	(Iб)		3,0	3,0	0,8
U ^{CH₂NHCOC₂CH₂NH₂}	(Iв)	3,0	1,0	2,1	1,1
U ^{CH₂NHR¹}	(IIа)	3,2	0,9	2,0	1,0
U ^{CH₂OCH₂CH₂NHR¹}	(IIб)	3,0	0,9	2,0	0,8
U ^{CH₂NHCOC₂CH₂NHR¹}	(IIв)	3,1	0,9	2,0	1,1
T	(V)	3,2	—	3,0	1,1

* Условия гидролиза и хроматографии описаны в работе [10].

Таблица 2
Температура плавления комплексов TAAGTGGAGTTTGGC (3')
T T C A C C X (5')

X	Реагент	T, пл., °C	X	Реагент	T, пл., °C
T		25	(R ³ NH(CH ₂) ₃ NH)pT	(IIг)	30
pT		25	U ^{CH₂NHR¹}	(IIа)	26
U ^{CH₂NH₂}	(Iа)	25	U ^{CH₂OCH₂CH₂NHR¹}	(IIб)	29
U ^{CH₂OCH₂CH₂NH₂}	(Iб)	27	U ^{CH₂NHCOC₂CH₂CH₂NHR¹}	(IIв)	29
U ^{CH₂NHCOC₂CH₂CH₂NH₂}	(Iв)	27	U ^{CH₂NHCOC₂CH₂CH₂NHR¹}	(IIIв)	29
			U ^{CH₂NHCOC₂CH₂CH₂NHR¹}	(IVв)	29

Примечание. Концентрация олигонуклеотидов 2·10⁻⁵ М в буфере 0,16 М NaCl, 0,02 М Na₂HPO₄, 0,1 мМ EDTA (pH 7,4).

Таблица 3

Фотомодификация мишени TAAGTGGAGTTTGGC
в присутствии реагента (IIв)

Реагент : мишень, моль/моль	Степень модификации (%) при темп- ратуре (°C)	
	22	4
2	22	38
6 *	42	
10	55	64
20		64

* Добавление реагента проводили 3 раза по 2 эка. Концентрация мишени 5·10⁻⁶ М, состав буфера указан в табл. 2.

Из приведенных данных видно, что оптимальное соотношение мишень – реагент составляет 1 : 10; дальнейшее увеличение избытка реагента до 20-кратного не приводит к повышению степени модификации матрицы. Как и следовало ожидать, эффективность воздействия на мишень заметно увеличивается при проведении фотомодификации при 4° С по

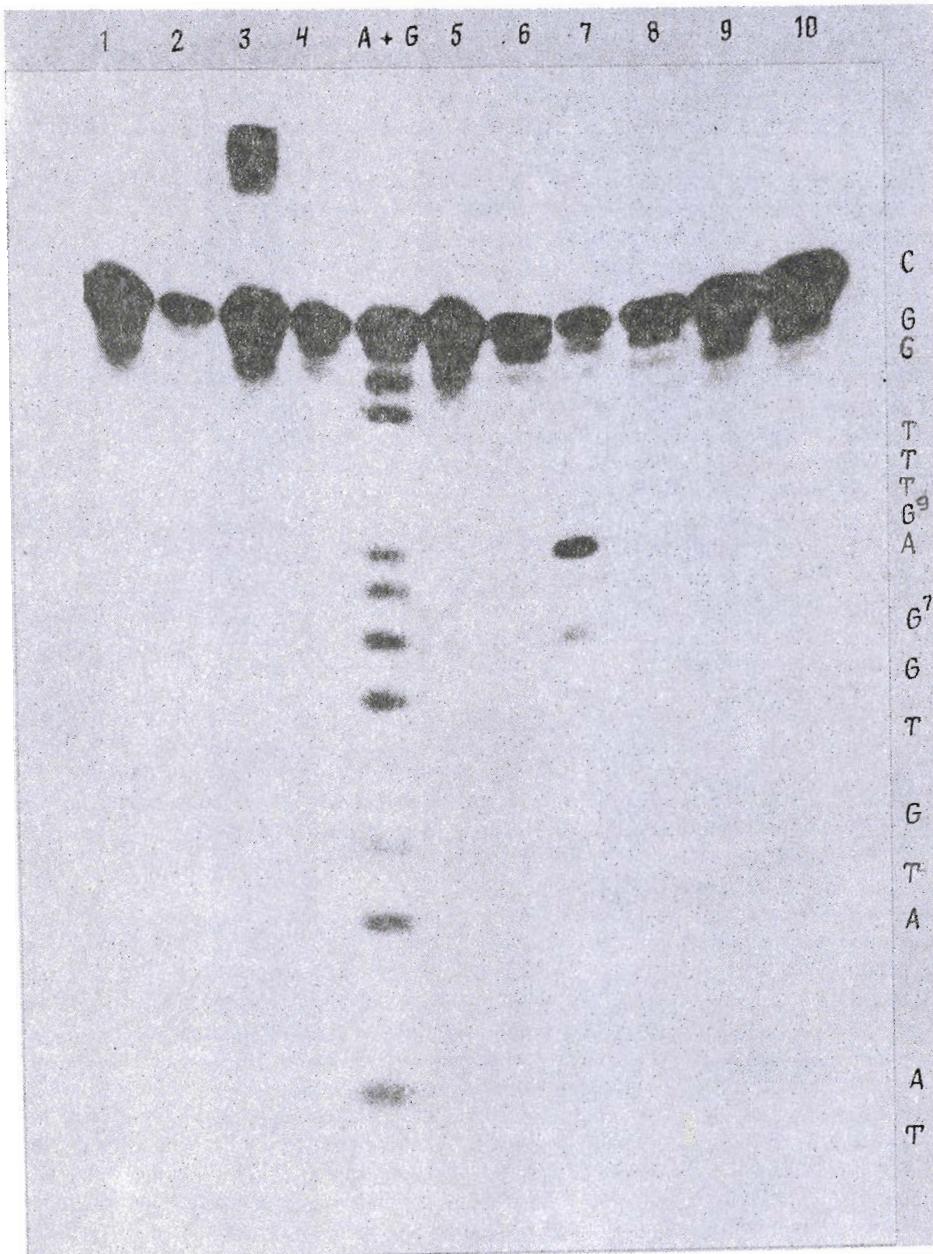
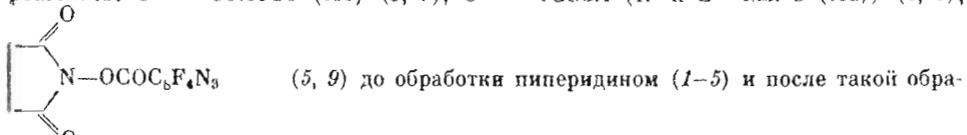


Рис. 2. Радиоавтограф геля, полученного при электрофоретическом анализе мишени ^{32}P TAAGTGGAGTTGCC, подвергшейся облучению фильтрованным светом ртутной лампы ДРК 120 (фильтры ВС-12, УФС-1) в отсутствие реагентов (1, 10), в присутствии комплементарного гептануклеотида TCCACTT (V) (2, 6), в присутствии фотопроявляющих реагентов: $\text{U}^{\text{LNH}}\text{CCACTT}$ (II ν) (3, 7), $\text{U}^{\text{LNH}}\text{TCCCA}$ (R' и L — как в (II ν)) (4, 8),



ботки (6–10). Дорожка A+G — продукты расщепления олигонуклеотидной мишени по остаткам пуринов. Концентрация мишени $5 \cdot 10^{-6}$ M, реагентов — $1 \cdot 10^{-5}$ M, 22° С
544

Таблица 4

Сравнение свойств производных ароматических азидов общей формулы $N_3\text{ArylNHR}^*$ (данные работы [11]) и эффективность модификации мишени TAAGTGGAGTTGGC фотоактивируемыми реагентами (IV ν)—(IV ν)

R	Свойства производных $N_3\text{ArylNHR}$		Характеристики модификации мишени реагентами ***		
	$\lambda_{\text{макс.}}$, нм ($\varepsilon \cdot 10^{-3}$)	$\tau_{1/2}^{**}$, мин	реагент	время облучения, мин	степень модификации, %
R ¹	251(18)	1,5	(IV ν)	5	64
R ²	315(6)	0,3	(III ν)	3	21
R ³	271(24)	1,0	(IV ν)	5	5

* Значения R¹, R², R³ для арилазидов как в соединениях (II ν)—(IV ν) соответственно.

** Фотолиз в растворе при диапазоне длии волн облучения 303—365 нм и мощности облучения $5 \cdot 10^{-4}$ Вт/см².

*** Концентрация мишени $5 \cdot 10^{-6}$ М, реагентов — $5 \cdot 10^{-5}$ М, состав буфера указан в табл. 2. 20° С.

сравнению с температурой, близкой к температуре плавления исследуемого дуплекса.

Для фотомодификации олигонуклеотидной матрицы были использованы кроме реагента (IV ν), содержащего *n*-азидотетрафторбензоильную группу, соединения (III ν) и (IV ν), имеющие остатки других ароматических азидов. Сравнение модифицирующих свойств соединений (II ν)—(IV ν) со свойствами ароматических азидов общей формулы $N_3\text{ArylNHR}$, имеющими соответственно те же заместители R¹—R³ по аминогруппе, позволяет сделать следующие выводы.

Введение NO₂-группы в *n*-положение к N₃-группе в R² по сравнению с R³ вызывает заметный батохромный сдвиг полосы поглощения, в 5 раз уменьшает $\tau_{1/2}$ и несколько увеличивает степень модификации мишени (табл. 4). Наличие атомов фтора в R¹ вызывает гипсохромный сдвиг полосы поглощения, вследствие этого замедляет скорость фотолиза в растворе в выбранном диапазоне облучения, но резко повышает степень фотомодификации мишени. Полученные результаты можно объяснить фотохимическими свойствами ароматических азидов. При облучении УФ-светом они генерируют разные активные промежуточные частицы: для R¹ характерно образование синглетного нитрена [11], для R² — триплетного нитрена [6, 11] и для R³, вероятнее всего, образование 1,2-азациклогентетатетраена [12]. Возможно, для модификации нуклеиновых кислот оказывается недостаточно реакционной способности частиц, образующихся из R² и особенно R³; для этой цели, по-видимому, наиболее перспективными могут быть фотореагенты на основе перфторированных ароматических азидов.

На следующем этапе была исследована фотомодификация мишени реагентами (II ν —г), содержащими наиболее эффективную перфторарomaticескую азидогруппу. Степень модификации определяли, как сказано выше, до обработки реакционной смеси пиперидином (рис. 3, 1—4). Для определения позиционной направленности фотомодификации аликовты реакционных смесей подвергали обработке пиперидином и также анализировали с помощью гель-электрофореза (рис. 3, 6—9). Результаты обсчета электрофорограмм приведены в табл. 5.

После обработки пиперидином большая часть продуктов модификации подвергается деструкции с разрывом мишени по модифицированным основаниям (рис. 3). В случае реагентов (II ν —г) заметна преимущественная модификация оснований G⁷, G⁹ и частично A⁸, пространственно

Фотомодификация в комплементарном комплексе



Реагент	X	Степень модификации*, %	Степень модификации по G°, %	Количество аддукта **, %
(IIa)	U ^{CH₂NHR'}	34	5	8
(IIб)	U ^{CH₂OCH₂CH₂NHR'}	67	26	17
(IIв)	U ^{CH₂NHCOCH₂CH₂NHR'}	64	20	16
(IIг)	R ¹ NH(CH ₂) ₃ NH ⁺ P' ⁻	70	26	19

* Степень модификации определена до обработки пиперидином.

** Аддукт, не расщепляющийся при обработке пиперидином (рис. 3, 6—9). Концентрация мишени 5·10⁻⁸ M, реагента — 5·10⁻⁵ M, состав буфера указан в табл. 2, 4⁵ С.

близких к реакционноспособной группе (рис. 3, 7—9). Эти реагенты модифицируют мишень с приблизительно равной эффективностью (64—70%). Предпочтение может быть отдано реагентам (IIб, г), поскольку в этом случае при достаточно высокой общей эффективности происходит преимущественная модификация по остатку G° (26%), а модификация по другим остаткам не превышает 7% (рис. 3, 7, 9). Реагент (IIa) с коротким спейсером оказался во всех отношениях наименее подходящим: степень модификации в этом случае была примерно в 2 раза меньше, чем для реагентов (IIб—г) (табл. 5); кроме того, наблюдалась слабая специфичность модификации мишени (рис. 3, 6).

Изложенные результаты свидетельствуют о том, что олигонуклеотидные реагенты с n-тетрафторбензоильной группой могут быть успешно использованы для адресованной фотомодификации нуклеиновых кислот, причем реагенты типа (IIб, г) наиболее перспективны для направленного расщепления последних в заданном участке.

Экспериментальная часть

В работе использовали олигонуклеотиды, синтезированные Н-фосфочатным методом на синтезаторе «Виктория-6М» [10]. Олигонуклеотиды, содержащие алифатическую аминогруппу в положении С5 остатка дезоксиуридуна, получали как описано в работе [8]. N-Оксисукцинимидные эфиры используемых ароматических азидов получали в соответствии с работой [13]. В работе использовали акриламид и N,N'-метиленбисакриламид (Serva, ФРГ). Оптическое поглощение исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре Specord M-40 (Carl Zeiss Yena, ГДР). Коэффициенты молярного поглощения олигонуклеотидов рассчитывали по методу [14] с учетом их значений для динуклеотидов [15]. Для TAAGTGGAGTTGGC $\epsilon = 146 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Значение коэффициента для U^{LNH₂}CCACTT считали равным таковому для немодифицированного гептануклеотида ($\epsilon_{260} = 58,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), а для U^{LNH₂}CCACTT — равным сумме значений коэффициентов для TCCACTT и амида соответствующей азидобензойной кислоты при 260 нм ($\epsilon_{260} = 73 \cdot 10^3$, $64 \cdot 10^3$ и $61 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для (IIa—г), (IIв) и (IVв) соответственно).

Кривые плавления комплементарных дуплексов записывали на установке для исследования термической денатурации в ультрамикромаштабе на базе спектрофотометра «Объ-4» (НИБХ СО АН СССР) [16].

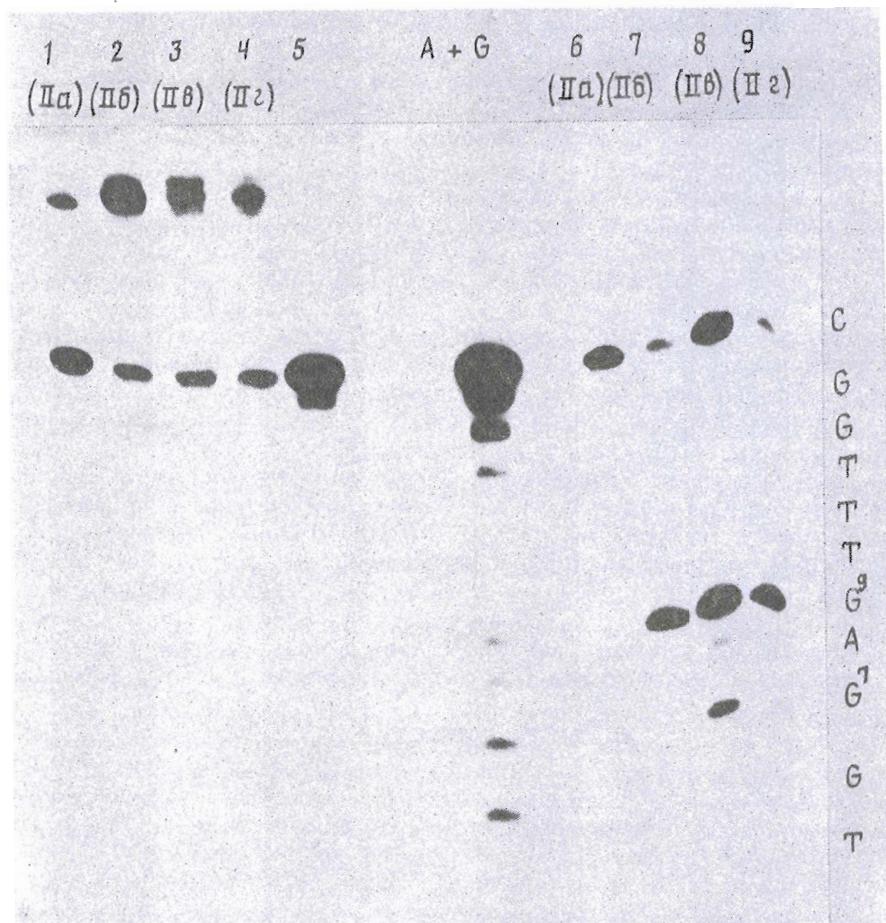


Рис. 3. Радиоавтограф геля, полученный при электрофоретическом анализе мишени ^{32}P -TAAGTGAGTTGGC, подвергшейся облучению в присутствии реагентов (IIa) (1, 6), (IIb) (2, 7), (IIc) (3, 8) и (IID) (4, 9) до обработки пиперидином (1-4) и после нее (6-9). Дорожка 5 — исходный пентадекануклеотид, дорожка A+G — продукты расщепления мишени по остаткам пуринов. Концентрация мишени — $5 \cdot 10^{-6}$ М, реагентов — $5 \cdot 10^{-5}$ М, 4°C

Получение $\text{U}^{\text{LNH}_2}\text{CCACTT}$ (IIa-e), (IIIe), (IVe) и $(\text{R}'\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH})\cdot\text{pTCCACTT}$ (IIe). К 5 ОЕ₂₆₀ гептануклеотида $\text{U}^{\text{LNH}_2}\text{CCACTT}$ или $(\text{NH}_2\cdot(\text{CH}_2)_3\text{NH})\text{pTCCACTT}$ в 15 мкл смеси вода — диметилформамид (1 : 2) добавляли через каждые 30 мин порциями по 10, 5 и 5 мкл раствор N-оксисукцинимидового эфира соответствующей азидобензойной кислоты (6 мкмоль в 20 мкл DMF). Через 30 мин после последнего добавления реагента реакционную смесь осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне, центрифугировали, промывали ацетоном и продукт выделяли обращенно-фазовой хроматографией (рис. 1). Выход в реакции ацилирования 70—80%.

Фотомодификация пентадекануклеотида. Образец (10 мкл), содержащий ^{32}P -TAAGTGAGTTGGC в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М и соответствующий азидосодержащий гептануклеотид в различных концентрациях (от $2 \cdot 10^{-6}$ до $2 \cdot 10^{-5}$ М) (буфер — 0,16 М NaCl, 0,2 М Na_2HPO_4 , 0,1 mM EDTA, pH 7,4), помещали в 1-мм кварцевую кювету, охлаждали вместе с ме-

тальническим кюветодержателем до 4° С и экспонировали под 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 $W_{303-365} = 5 \cdot 10^{-4}$ Вт/см²·с. Время экспозиции в случае реагентов (IIa–g) и (IVb) 5 мин, в случае реагента (IIIb) 3 мин.

Анализ продуктов фотомодификации. После облучения половину реакционной смеси осаждали раствором 2% LiClO₄ в ацетоне и анализировали с помощью гель-электрофореза в 20% ПААГ (8 М мочевина, 0,05 М трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA). Степень модификации рассчитывали исходя из данных распределения ³²P-метки в дорожках геля; при этом из геля вырезали участки, содержащие не подвергшийся модификации пентадекануклеотид, и участки, имеющие подвижность, меньшую по сравнению с исходной мишенью, соответствующие продуктам модификации. Радиоактивность определяли на счетчике Mark III (Nuclear Chicago, США). Степень модификации определяли как отношение радиоактивности соответствующих участков к общей радиоактивности в дорожке.

Денситометрические профили дорожек радиоавтографа получали с помощью лазерного сканера LKB Ultroscan XL (Швеция).

Для определения позиционной направленности модификации вторую половину реакционной смеси подвергали обработке 10% водным пиридином (30 мин, 100° С), после чего анализировали с помощью гель-электрофореза как описано выше. Распределение вещества в дорожках геля определяли по денситометрическим профилям дорожек радиоавтографа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pieles U., English U. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 1. P. 285–299.
2. Nakamura Y. // Chem. Lett. 1989. № 1. P. 51–54.
3. Benimetskaya L. Z., Bulychev N. V., Kozionov A. L., Koshkin A. A., Lebedev A. V., Novozhilov S. Yu., Stockman M. I. // Biopolymers. 1989. V. 28. № 6. P. 1129–1147.
4. Добриков М. И., Шишкин Г. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1990. Вып. 6. С. 50–58.
5. Praseuth D., Perrouault L., Le Doan T., Chassignol M., Thuong N. T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 1349–1353.
6. Починок А. В., Починок В. Л., Авраменко А. Д., Кондратенко П. А., Скопенко В. Н., Нагорный В. Н., Чубисова Н. П. // Укр. хим. журн. 1979. Т. 45. № 42. С. 1204–1211.
7. Keppa J. F. W., Cai S. X. // J. Fluorine Chem. 1989. V. 43. P. 151–154.
8. Зарытова В. Ф., Комарова Н. И., Левина А. С., Лохов С. Г., Табатадзе Д. Р., Халимская Л. М., Александрова Л. А. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1059–1065.
9. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Мальцева Т. В., Халимская Л. М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1246–1252.
10. Веньяминова А. Г., Горн В. В., Зенкова М. А., Комарова Н. И., Репкова М. Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 941–950.
11. Young M.-I. T., Platz M. S. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 17. P. 1299–2202.
12. Purvis R., Smalley R. K., Strchan W. A., Suschitsky H. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1978. V. 3. P. 191–195.
13. Добриков М. И., Приходько Т. А., Сафонов И. В., Шишкин Г. В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18–23.
14. Cantor C. R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65–77.
15. Fasman T. E. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Clevel and Nucl. Acids CRC Press. 1975. V. 1. P. 597.
16. Grachev M. A., Perelroyzen M. P. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 7. P. 2557–2564.

Поступила в редакцию
16.V.1991

M. I. DOBRIKOV, V. F. ZARYTOVA, N. I. KOMAROVA, A. S. LEVINA,
S. A. LOKHOV, T. A. PRIKHODKO, G. V. SHISHKIN, D. R. TABATADZE*,
M. M. ZAALISHVILI*

EFFECTIVE SEQUENCE-SPECIFIC PHOTOMODIFICATION OF NUCLEIC
ACIDS BY OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES BEARING AROMATIC
AZIDO GROUPS

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

* *Institute of Molecular Biology and Biophysics, Academy of Sciences
of Georgia, Tbilisi*

Highly effective site-specific photomodification of a DNA-target was carried out with oligonucleotide reagents carrying aromatic azido groups. Oligonucleotide derivatives with a photoactive function R on the 5'-terminal phosphate and at C-5 atom of deoxyuridine were synthesized: $R^1\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHpd(TCCACTT)}$ and $d(\text{UL}^{N\text{HR}}\text{CCACTT})$, where R^1 is *p*-azidotetrafluorobenzoyl, R^2 is 2-nitro, 5-azidobenzoyl, R^3 is *p*-azidobenzoyl; $\text{LNH} = -\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ or $-\text{CH}_2\text{NHCOC}_2\text{CH}_2\text{NH}-$. The prepared compounds form stable complementary complexes and effect site-specific photomodification of the target DNA. The modification of pentadecanucleotide $d(\text{TAAAGTGGAGTTGGC})$ with the reagents was investigated. Maximum extent of modification strongly depended on the reagent's type, the photoreagent with R^1 being the most effective. Whatever the binding site was, this agent provided a 65–70% modification in all cases except $\text{LNH} = -\text{CH}_2\text{NH}-$, when the yield was twice lower. For the reagents bearing R^1 the modification sites were identified. Selective modification at the G⁹ residue was detected in the case of $\text{LNH} = -\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ and when a photoactive group was linked to the terminal phosphate.