



УДК 547.963.32.07:577.113.6+577.113.4

© 1992 г. В.Ф. Зарытова, А.С. Левина, Л.М. Халижская*,
З.А. Сергеева

**КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРОИЗВОДНЫМИ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИМИ АЛКИЛИРУЮЩУЮ
ГРУППУ В С-5-ПОЛОЖЕНИИ ДЕЗОКСИУРИДИНА**

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

Получен новый тип алкилирующих производных олигонуклеотидов, несущих в положении С-5 остатка дезоксиуридина 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензильную (RCl) группу и обеспечивающих высокую степень модификации ДНК-мишени. Синтезированы реагенты $U^{LNHRCl}SSACTT$, где $L = -CH_2-$ (Ia), $-CH_2OCH_2CH_2-$ (Iб) и $-CH_2NHCOCH_2CH_2-$ (Iв), и с их использованием осуществлена эффективная (80–90%) модификация мишени $TAAGTGGAGTTTGGC$. Показано, что при использовании производных (Ia) и (Iб) алкилируются в основном остатки G^6 , G^7 и G^9 , в случае же производного (Iв) реакция идет практически по одному основанию – G^6 .

Для комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот широко используются олигонуклеотидные реагенты, содержащие в своей структуре алкилирующие группировки. Чаще всего их присоединяют к концевому фосфату или к 2',3'-*цис*-диольной группе рибозы, причем от места присоединения зависит направленность и эффективность модификации НК-мишени [1–3]. В настоящее время появляются также работы, в которых описано применение производных олигонуклеотидов с модифицирующими группами, присоединенными к гетероциклическому основанию одного из нуклеозидов [4–7]. Такие группы могут оказаться пространственно приближенными к НК-мишени и за счет этого эффективно воздействовать на нее в строго определенной точке [5].

В данной работе впервые описан синтез 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензильных производных гептануклеотидов $U^{LNHRCl}SSACTT$ (Ia–в) и исследована аффинная модификация ими пентадекануклеотида (II) (схема 1). Гептануклеотиды $U^{LNHRCl}SSACTT$, содержащие на 5'-конце али-

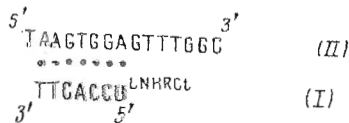
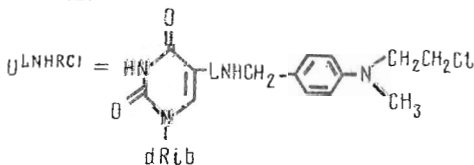


Схема 1



- a) $L = -CH_2-$
- б) $L = -CH_2OCH_2CH_2-$
- в) $L = -CH_2NHCOCH_2CH_2-$

Сокращения: RCl – 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензильный остаток, НК – нуклеиновая кислота; ОФХ – обращенно-фазовая хроматография; префикс «d» в написании дезоксиуклеотидов опущен.

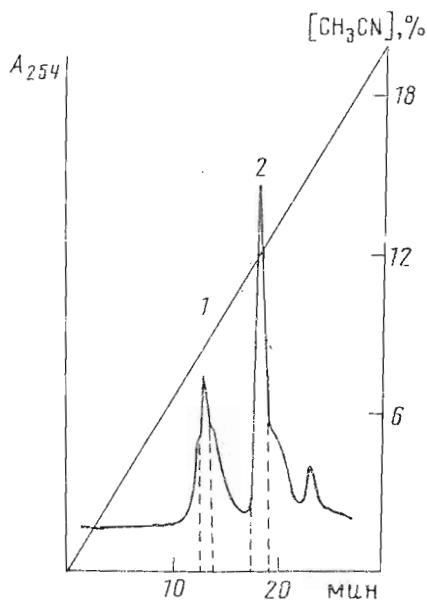
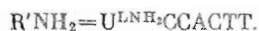
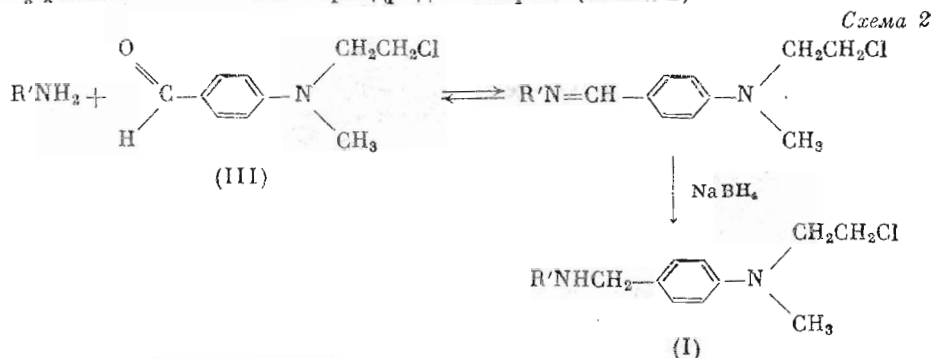


Рис. 1. ОФХ продуктов реакции после синтеза производного (Iв): 1 — исходный гептануклеотид $U^{LNH_2}CCACTT$; 2 — продукт реакции (Iв). Колонка (4,6×250 мм) с Lichrosorb RP 18; градиент концентрации ацетонитрила в 0,05 М растворе $LiClO_4$. Скорость элюции 2 мл/мин

фатическую аминогруппу, присоединенную по 5-положению дезоксиуридина через спейсеры L разной длины, были синтезированы как описано в работе [8].

Остаток RCl вводили при помощи реакции производного бензальдегида (III) с аминогруппой гептануклеотида, затем образующееся основание Шиффа восстанавливали боргидридом натрия (схема 2).



После реакции продукты (I) выделяли с помощью ОФХ. Как видно из профиля хроматографии соединения (Iв) (рис. 1), наличие гидрофобной группы RCl приводит к заметному увеличению времени удерживания производных (Iа–в) по сравнению с исходным аминоксодержащим олигонуклеотидом. Выход продуктов (Iа–в), оцененный по данным ОФХ, составляет 20–50%. Содержание ковалентно связанного хлора в производных (Iа–в) составляет 80–90%. Это означает, что предложенным способом можно получать алкилирующие производные олигонуклеотидов с высоким содержанием хлора.

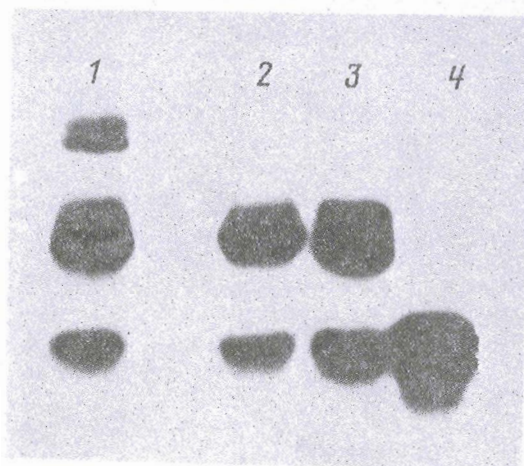


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов алкилирования (48 ч, 22° С) мишени ^{32}P ТААГТГГАГТТТГСС (II) реагентами (Iб) (1), (Iв) (2), (Iа) (3); дорожка 4 – мишень (II). Концентрация реагентов $1 \cdot 10^{-5}$ М, олигонуклеотида (II) – $1 \cdot 10^{-6}$ М

Были исследованы комплексообразующие свойства полученных производных. Для этого соединения (Iа–в) предварительно гидролизовали при 22° С в течение 2 сут (время, достаточное для практически полного гидролиза С–Сl-связи в RCl-фрагменте [9]). Комплексы пентадекануклеотида (II) с полученными производными плавятся при температуре 24–26° С, близкой к температуре плавления дуплекса с участием немодифицированного гептануклеотида ТССАТТ (25° С). Таким образом, описанная выше модификация олигонуклеотидов не уменьшает их способности к комплексообразованию, что дает возможность использовать полученные производные для комплементарно адресованного воздействия на НК.

Адресованную модификацию ^{32}P -меченой мишени (II) проводили в течение 48 ч при 22° С, используя реагенты (Iа–в) в различном отношении к мишени (1 : 1 и 10 : 1); затем реакционные смеси анализировали с помощью гель-электрофореза.

Образуются продукты модификации мишени (II), имеющие меньшую подвижность, чем исходный пентадекануклеотид (рис. 2). Определение степени и позиционной направленности модификации проводили по данным электрофореза после расщепления мишени пиперидином по остаткам алкилированных пуринов [10]. Как видно из рис. 3, при использовании реагентов (Iа, б) модификация подвергается в основном остатки G⁶, G⁷ и G⁹ мишени (II), причем соотношение предельных степеней модификации G⁶ : G⁷ : G⁹ составляет для реагента (Iа) приблизительно 2 : 1 : 3, для реагента (Iб) – 1 : 2 : 1. В случае же реагента (Iв) алкилирование происходит главным образом по основанию G⁶. При соотношении реагент – мишень, равном 1 : 1, степень модификации мишени составляет примерно 60%, тогда как при использовании 10-кратного избытка реагентов (Iа–в) степень модификации достигает 80–90%.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что алкилирующие производные олигонуклеотидов, в которых группа RCl присоединена к гетероциклическому основанию остатка дезоксиуридина, могут быть эффективными реагентами для модификации нуклеиновых кислот. Наиболее перспективным представляется реагент (Iв) со спейсером L = = -CH₂NHCOCH₂CH₂-, обеспечивающий почти количественную модификацию мишени в одной определенной точке, что обычно не наблюдается

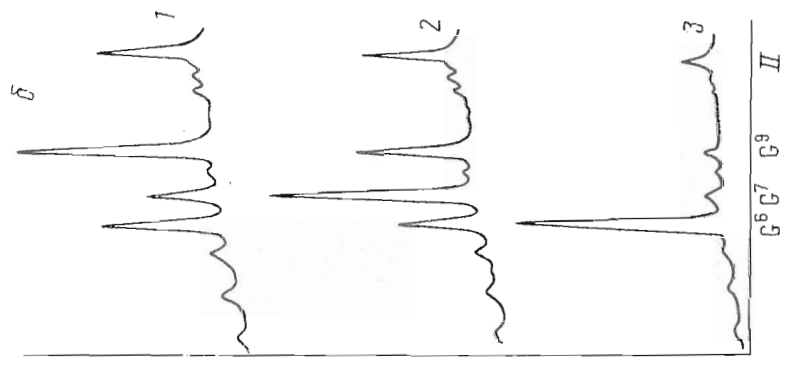
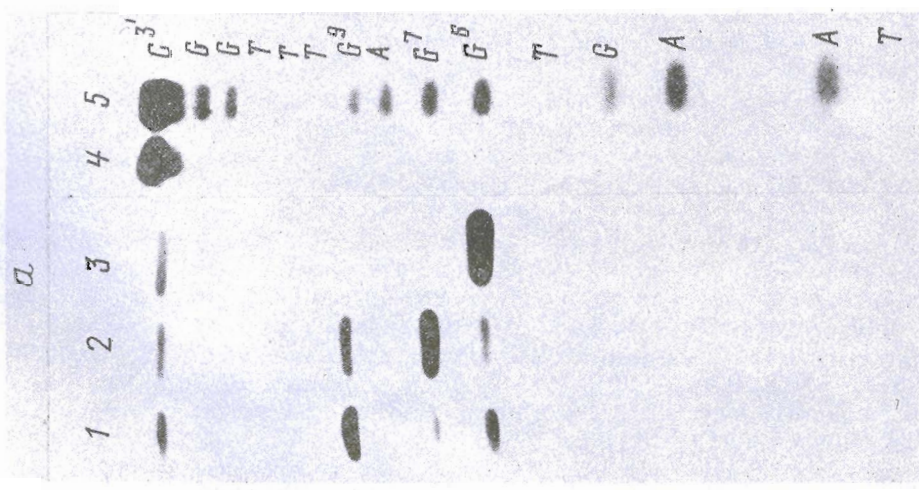


Рис. 3. а - электрофорограмма продуктов алкилирования мн-лени (II) реагентами (Ia-в) (дорожки 1-3 соответственно) после обработки реакционной смеси пиперилином; продукты частичного расщепления олигонуклеотида (II) по остаткам пуринов (5); олигонуклеотид (II) (4). Концентрация мишени 10^{-6} М, реагентов - 10^{-5} М. б - денситограммы дорожек 1-3 радиоавтографы гели

для производных олигонуклеотидов с остатком RCl, присоединенным к концевому фосфату или 2',3'-*цис*-диольной группе рибозы.

Экспериментальная часть

В работе использованы 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензальдегид, полученный Т. М. Ивановой, и пентадекануклеотид, синтезированный В. В. Горном (НИБХ СО АН СССР), акриламид, *N,N*-метиленибисакриламид (Serva, ФРГ). Гептануклеотиды $U^{LNH}CCASTT$ синтезировали *N*-фосфонатным методом на синтезаторе «Виктория-6М» с использованием защищенных 5'-*N*-фосфонатов дезоксиуридина, модифицированного по положению С-5 в соответствии с работой [8].

Оптическое поглощение исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре Spесord M-40 (Carl Zeiss, Yena, ГДР). Коэффициенты молярного поглощения олигонуклеотидов (ϵ) рассчитывали с учетом значений ϵ для динуклеотидов [11, 12]. Значение ϵ для $U^{LNH}CCASTT$ считали равным таковому для немодифицированного гептануклеотида ($\epsilon_{260} = 58,3 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹), а для $d(U^{LNHRCI}CCASTT)$ — равным сумме значений ϵ_{260} для TCCASTT и остатка RCl ($14,7 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹) [13]. Для TAAAGTGGAGTTTGGC $\epsilon_{260} = 146 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹. Содержание хлора в реагентах (Ia—v) определяли при помощи реакции с $Na_2S_2O_3$ [14].

Кривые плавления комплементарных олигонуклеотидных дуплексов записывали на установке для исследования термической денатурации в ультрамикромасштабе на базе спектрофотометра «Обь-4» (НИБХ СО АН СССР) [15]. Плавление комплексов и модификацию пентадекануклеотида проводили в буфере, содержащем 0,16 М NaCl, 0,02 М Na_2HPO_4 , 0,1 мМ EDTA, pH 7,4. Концентрации олигонуклеотидов при плавлении $2 \cdot 10^{-5}$ М. Время, необходимое для проведения реакции алкилирования или гидролиза реагентов, было рассчитано по данным работы [9] и составляло при 22° С 48 ч.

Реакционные смеси подвергали электрофорезу в 20% ПААГ (8 М мочевины, 0,05 М трис-борат, pH 8,5, 1 мМ EDTA, ~40° С). После радиоавтографии участки, содержащие радиоактивный материал, вырезали и измеряли их радиоактивность по Черенкову на счетчике Mark III (Nuclear Chicago, США). Денситометрические профили дорожек радиоавтографов получали, используя лазерный сканер Ultroscaп XL (LKB Bromma, Швеция).

Расщепление цепи модифицированного пентадекануклеотида (II) по остаткам алкилированных пуринов проводили при 95–100° С 10% водным раствором пиперидина в течение 30 мин [10]. Олигонуклеотидный материал осаждали из реакционных смесей 2% раствором $LiClO_4$ в ацетоне.

$U^{LNHRCI}CCASTT$ (Ia—e). К раствору 5–10 OE_{260} (0,09–0,17 мкмоль) $U^{LNH}CCASTT$ в 4 мкл воды добавили 3 мкл (21 мкмоль) триэтиламина и раствор 1 мг (5 мкмоль) производного бензальдегида (III) в 8 мкл этанола. Через 15–25 мин добавили 1,5 мг (40 мкмоль) $NaNH_2$ и еще через 30 мин олигонуклеотидный материал осадил 2% раствором $LiClO_4$ в ацетоне. Продукты выделили ОФХ; степень превращения для соединений (Ia—v) составила 20–50% (0,6–1,0 OE_{260} выделенного продукта). На рис. 1 приведен профиль ОФХ после синтеза производного (Iv); реагент (Iv) выделен в количестве 0,7 OE_{260} .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vlassov V. V., Zarytova V. F., Kut'yavin I. V., Mamayev S. V., Podymnugin M. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 4065–4076.
2. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Мамеев С. В., Подуст Л. И., Федорова О. С. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221–1229.

3. Бросалина Е. В., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плегнев А. Г., Подыминогов М. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240-247.
4. Nagalambidis J., Chai H., Tregear G. W. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 12. P. 4857-4876.
5. Beyer R. B., Jr., Tabone J. C., Hurst G. D., Smith T. M., Gamper H. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 18. P. 8517-8519.
6. Telser J., Cruickshank K. A., Morrison L. E., Netzel T. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 18. P. 6966-6976.
7. Telser J., Cruickshank K. A., Shanze K. S., Netzel T. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 18. P. 7221-7226.
8. Зарытова В. Ф., Комарова Н. И., Левина А. С., Лохов С. Г., Табагадзе Д. Р., Халимская Л. М., Александрова Л. А. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1059-1065.
9. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чумитова Т. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210-214.
10. Mazat A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499-560.
11. Cantor C. R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65-77.
12. Fasman T. E. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Cleveland Nucl. Acids CRS Press, 1975. V. 1. P. 597.
13. Барам Г. И., Буцева В. Н., Добрикова Е. Ю., Петров В. Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 613-620.
14. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогов М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212-1220.
15. Grachev M. A., Perelroizen M. P. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 7. P. 2557-2564.

Поступила в редакцию
21.VI.1994

V. F. ZARYTOVA, A. S. LEVINA, L. M. KHALIMSKAYA*, Z. A. SERGEEVA
SEQUENCE-SPECIFIC MODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS
BY OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES WITH AN ALKYLATING GROUP
AT C-5 OF DEOXYURIDINE

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

* *Novosibirsk State University, Novosibirsk*

A new type of alkylating derivatives of oligonucleotides with 4(N-methyl-N-2-chloroethylamino)benzyl (RCl) group at C-5 of deoxyuridine with a high extent of the target modification was prepared. The synthesized reagents $d(U\overset{1}{L}N\overset{5}{H}RClCCACTT)$, where $L=CH_2$ (Ia), $CH_2OCH_2CH_2$ (Ib) and $CH_2NHCOCH_2CH_2$ (Ic), proved to effectively (80-90%) modify the oligonucleotide $d(TA\overset{1}{A}CTGG\overset{5}{A}GTTTGGC)$. The reagents (Ia) and (Ib) alkylate G⁵, G⁷ and G⁹ positions, while the reagent (Ic) modifies predominantly G⁹.