



УДК 547.963.057:577.113.6

© 1992 г. М. И. Добриков, В. В. Горн,
В. Ф. Зарытова, А. С. Левина, Т. А. Приходько,
Г. В. Шикин, Д. Р. Табатадзе*, М. М. Заалишвили*

КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ АРИЛАЗИДНЫМИ И
ПЕРФТОРАРИЛАЗИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
II*. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПО ОТНОШЕНИЮ
К НУКЛЕОЗИДАМ*

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск;
* Институт молекулярной биологии и биофизики АН Грузии, Тбилиси

Показано, что использование олигонуклеотидных реагентов, содержащих ароматические азидогруппы различного строения, дает возможность проводить нуклеозид-специфическую фотомодификацию нуклеиновых кислот. Исследована модификация пентадекануклеотидов-мишеней TAAAGTGGAGTTTGGG (M-G), TAAAGTGGAAAAA (M-A), TAAAGTGGACCCCCC (M-C), TAAAGTGGATTTT (M-T) реагентами $U_{CH_3OCH_2CH_2N_3}$ и $CCACCTT$, содержащими при C5-атоме дезоксиуридина фотоактивную группировку R (R^1 – *n*-азидотетрафторбензоил – реагент (I), R^2 – 2-нитро-5-азидобензоил – реагент (II), R^3 – *n*-азидобензоил – реагент (III)). В случае реагента (III) фотомодификация не превышает 5% для всех мишеней; предельная степень модификации реагентом (II) составляет 25–50% в зависимости от мишени; наиболее эффективен реагент (I) с перфторированной арилазидогруппой, дающий 60–75% модификации. Реагенты (I) и (II) чувствительны к нуклеозидной последовательности мишени; наиболее уязвимым для реагента (I) оказался гуаниновый, а для реагента (II) – цитозинный остаток. Оба реагента модифицируют преимущественно основание мишени, непосредственно примыкающее к участку, находящемуся в дуплексе с олигонуклеотидным адресом.

В предыдущей работе [1] была исследована комплементарно адресованная фотомодификация гептадекануклеотида-мишени олигонуклеотидными реагентами, содержащими разные ароматические азидогруппы: *n*-азидотетрафторбензоильную (I), 2-нитро-5-азидобензоильную (II) и *n*-азидобензоильную (III). Было показано, что предельная степень модификации существенно зависит от строения арилазидного остатка. Наиболее перспективным оказался реагент (I) с перфторированным ароматическим кольцом. Степень модификации достигала 65%, причем преимущественным местом модификации был гуанозинный остаток, находящийся в непосредственной близости от реакционноспособной группы.

Известно, что при облучении УФ-светом фотореакционные группы реагентов (I), (II) и (III) генерируют разные активные промежуточные частицы. Для реагента (I) характерно образование синглетного нитрена [2, 3], для реагента (II) – триплетного нитрена [4–6] и для реагента (III) вероятнее всего образование 1,2-азациклогептатетраена [7, 8]. Все указанные активные частицы, по-видимому, обладают различной реакционной способностью и специфичностью по отношению к нуклеиновым кислотам и, в частности, к различным нуклеотидам. В связи

* Сообщение 1 см. [1].

Префикс «ф» везде в обозначении олигонуклеотидов опущен.

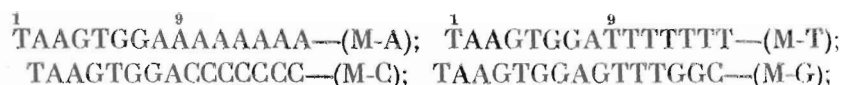
Модификация олигонуклеотидных мишеней фотореагентами (I) и (II)

Мишень Реагент	М-А		М-С		М-Т		М-Г	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Выход продуктов ковалентного присоединения, %	45	10	45	15	40	15	65	20
Степень модификации после обработки пиперидином *	50	20	50	45	50	30	65	35

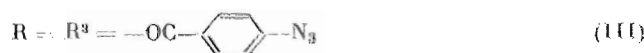
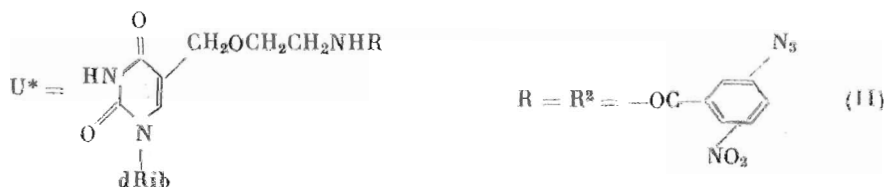
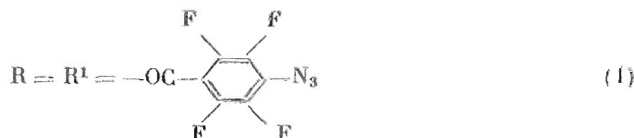
* За вычетом неспецифического расщепления мишени, которое составляет 10% [1].

с этим представляет интерес сравнить эффективность воздействия перечисленных фотореагентов на олигонуклеотидные мишени, содержащие разные пуриновые и пиримидиновые основания в предполагаемом месте модификации.

В настоящей работе была исследована фотомодификация следующих олигонуклеотидных мишеней:



В качестве фотореагентов использовали гептануклеотиды U*CCACTT (I–III), содержащие остаток дезоксиуридина с арилизидной группой в положении С5.



Фотомодификацию олигонуклеотидных мишеней (М-А, М-Т, М-С и М-Г) проводили в условиях, подобранных в предыдущей работе [1].

При анализе реакционных смесей после фотомодификации мишеней М-А, М-С, М-Т и М-Г реагентами (I) и (II) во всех случаях наряду с полосой, соответствующей по подвижности исходной мишени (А), наблюдаются продукты фотосшивки с меньшей электрофоретической подвижностью (Б) (рис. 1).

Из табл. 1 видно, что в рассмотренных превращениях фотореагент (I) вызывает существенно больше ковалентных сшивок реагента с мишенью, чем реагент (II). Для обоих реагентов количество ковалентных сшивок зависит от состава мишени; максимальный выход ковалентных аддуктов наблюдается для олигонуклеотида М-Г.

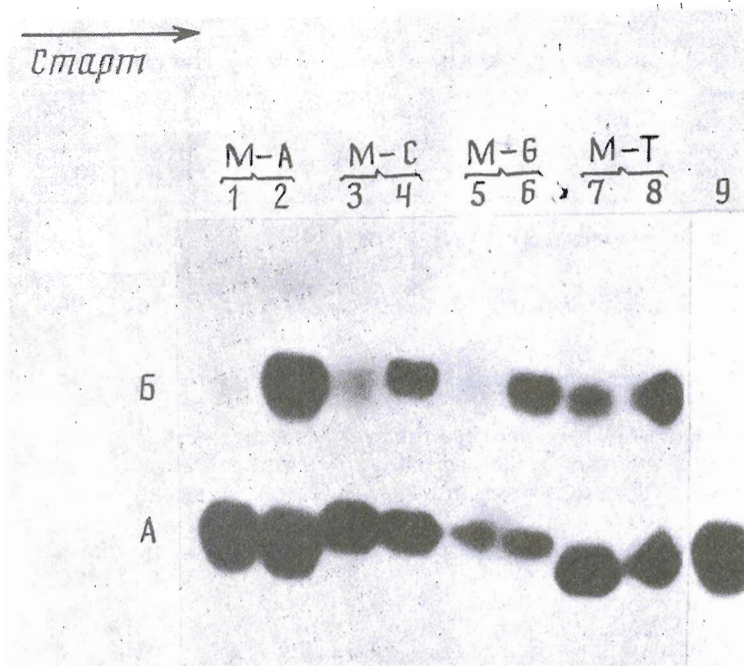


Рис. 1. Радиоавтограф геля, полученный при электрофоретическом анализе 5'-³²P-меченых мишеней ТААГТГГАААААААА (М-А), ТААГТГ-ГАССССССС (М-С), ТААГТГГАГТТТТГСС (М-Г), ТААГТГГАТТТТТТТ (М-Т), подвергшихся облучению фильтрованным светом ртутной лампы ДРК-120 (фильтры БС-12, УФС-1) в присутствии олигонуклеотидного реагента (I) (дорожки 2, 4, 6, 8) и реагента (II) (дорожки 1, 3, 5, 7); дорожка 9 — исходная мишень М-Т

Для изучения щелочелабильных продуктов модификации мишеней реакционные смеси анализировали после их обработки пиперидином. На рис. 2 в качестве примера приведен радиоавтограф, полученные при анализе продуктов модификации мишени М-С. Значение степени модификации, определенное после такой обработки (табл. 1), увеличивается за счет скрытой модификации мишени (т. е. модификации, не приводящей к ковалентному связыванию олигонуклеотидного реагента с мишенью). Во всех случаях фотомодификация реагентом (II) приводит к большей скрытой модификации по сравнению с реагентом (I). Наибольший вклад скрытой модификации наблюдается для мишени М-С.

В случае реагента (III) степень модификации не превышала 5%. Этот результат согласуется с литературными данными. Так, в работе [7] показано, что выход одностебельных разрывов ДНК-мишени *p*-азидобензамидными производными интеркалирующих красителей составляет 0,6%, а щелочелабильной модификации — 6%, причем установлено, что скрытая модификация затрагивает исключительно гуанозиновый остаток. Таким образом, фотореагент (III) малоприменим для эффективной комплексно адресованной модификации нуклеиновых кислот, по-видимому, вследствие низкой реакционной способности образующегося при фотолизе 1,2-азапентатетраена по отношению к нуклеиновым кислотам. В то же время, по данным работы [8], эффективность фотомодификации белков реагентом такого типа достигает 40%, поэтому реагент (III) может оказаться перспективным для изучения белок-нуклеиновых взаимодействий.

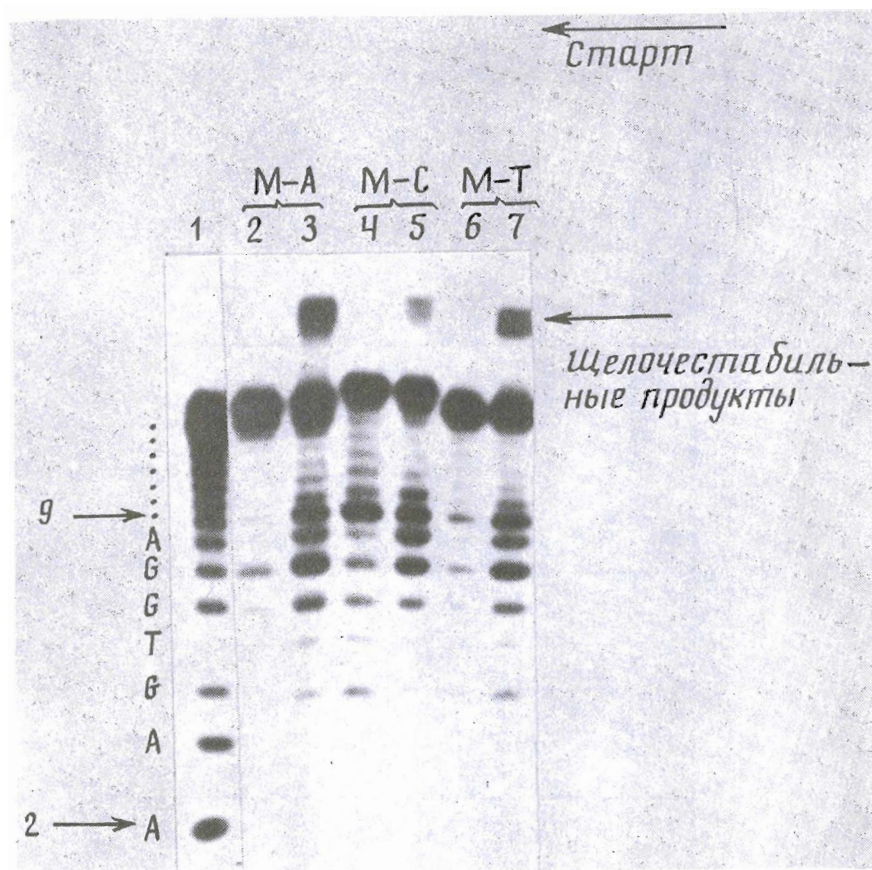


Рис. 2. Радиоавтограф продуктов фотомодификации мишеней М-А, М-С и М-Т реагентом (I) (дорожки 3, 5, 7) и реагентом (II) (дорожки 2, 4, 6) после обработки пиперидином; дорожка 1 — продукты деградации мишени М-А по остаткам пуринов

Позиционную направленность щелочеллабильной фотомодификации всех четырех мишеней фотореагентами (I) и (II) определяли после пиперидиновой обработки. Результаты приведены на рис. 3 в виде гистограмм, полученных при обчете денситограмм соответствующих дорожек радиоавтографа. Обнаруживается различная специфичность реагентов к разным основаниям. Видно, что щелочеллабильной модификации реагентом (I) подвергается предпочтительно остаток гуанина, а реагентом (II) — остаток цитозина. Очевидно, это связано с разными фотохимическими свойствами реагентов. Оба реагента преимущественно модифицируют 9-е положение мишени, если в этом месте находится предпочитаемое гетероциклическое основание; если в 9-м положении находится другой нуклеозид, модификации подвергается также находящийся рядом остаток G в случае реагента (I) и T — в случае реагента (III). С точки зрения предпочтительности модификации нуклеозиды располагаются в следующем порядке: $G > C \approx T \approx A$ для реагента (I) и $C > T > G \gg A$ для реагента (II). Нитроарилазидный реагент (II) отдает заметное предпочтение пиримидиновым основаниям; при этом в основном происходит скрытая модификация мишени (ср. данные табл. 1). Практически полностью отсутствует модификация аденозина.

Полученные результаты согласуются с данными работы [9], где показано, что *n*-азидофекальные производные олигонуклеотидов, для

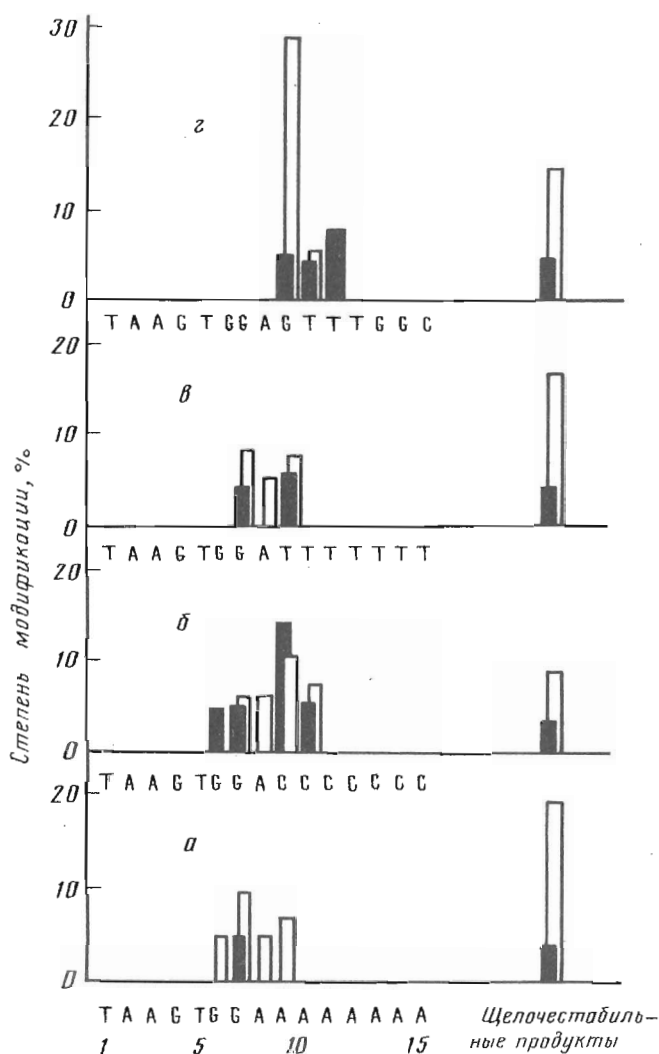


Рис. 3. Гистограммы, полученные при анализе продуктов фотомодификации мишеней после их обработки пиперидином (соответствующая электрофореграмма приведена на рис. 2). Результат воздействия реагентов (I) (светлые столбики) и (II) (темные столбики) на мишени М-А (а), М-С (б), М-Т (в) и М-Г (г)

которых так же, как для реагента (II), характерно образование триплетного нитреда [4], модифицируют ДНК-мишень по пиримидиновым основаниям, — вероятнее всего, по двойной связи $C5=C6$.

Во всех случаях после пиперидиновой обработки остается значительное количество продуктов сшивки, не подвергающихся расщеплению. Для фотореагента (II) выход щелочестабильных продуктов мал (4–5%) и практически не зависит от строения мишени. Для фотореагента (I) выход подобных продуктов заметно выше (достигает 20%). Не расщепляющиеся пиперидином продукты практически всегда образуются при фотомодификации нуклеиновых кислот (например, [9, 10]). В литературе не приводятся данные о строении этих аддуктов. На наш взгляд,

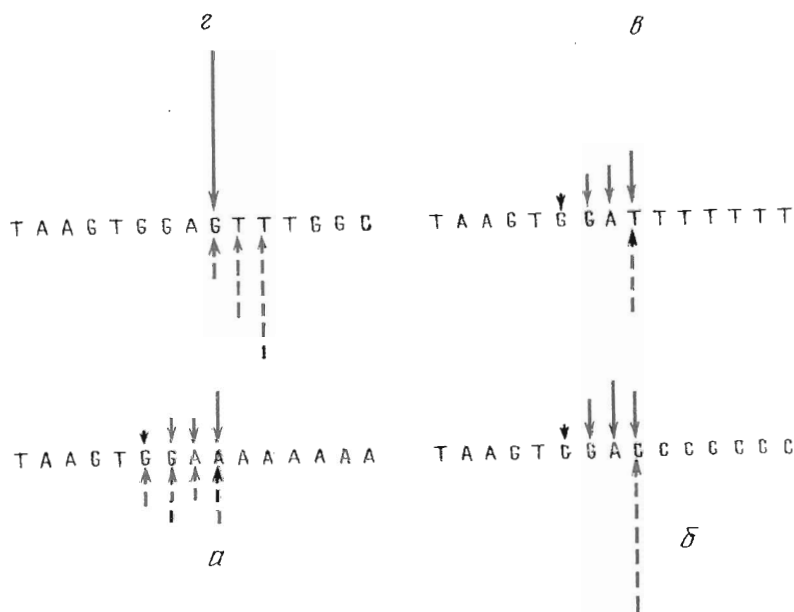


Рис. 4. Направленность и относительная степень модификации мишеней М-А (а), М-С (б), М-Т (в) и М-Г (г) реагентом (I) после обработки пиперидином фракций А и Б (см. рис. 1). Штриховые стрелки отражают скрытую модификацию, сплошные — образование ковалентных щелочелabileльных продуктов

один из возможных вариантов такой модификации — внедрение нитрена по связи С8—Н пуринов.

Ввиду того что реагент (I) оказался более эффективным для комплементарно адресованной фотомодификации ДНК-мишеней, для него был проделан дополнительный анализ, заключающийся в том, что обработке пиперидином подвергались по отдельности две фракции реакционной смеси, одна из которых совпадает по электрофоретической подвижности с исходной матрицей (А), а вторая (Б) соответствует аддуктам ковалентного присоединения реагента к мишени (см. рис. 1). Результаты приведены на рис. 4.

При обработке пиперидином фракции А обнаруживается скрытая модификация, о которой говорилось выше. Относительно всего количества вещества в этой фракции она составляет 30—40% и максимальна для мишени М-С. В случае мишеней М-С и М-Т она происходит преимущественно по 9-му положению, где находится пиримидиновое основание. В случае М-Г модификации подвергаются в большей степени положения 10 и 11, где расположены остатки тимина. При отсутствии Т и С вблизи места модификации (М-А) скрытая модификация не имеет выраженного характера (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что скрытая модификация мишени фотореагентом (I), как и реагентом (II) (см. выше), предпочтительнее происходит по пиримидиновым основаниям.

При обработке пиперидином продуктов ковалентного присоединения (фракция Б) проявляется три разных типа модификации: частично регенерируется исходная мишень ($\approx 20\%$), остается значительное количество щелочестойких продуктов (20—40%), и происходит расщепление щелочелabileльных аддуктов (50—60%). Обращает на себя внимание следующий факт: в случае мишени М-Г среди щелочелabileльных аддуктов

значительно преобладает продукт модификации по 9-му, гуаниновому остатку, в то время как во всех других случаях такого преобладания не наблюдается (рис. 4). Возможно, реакция происходит по N7-положению гуанина, поскольку известно, что синглетный нитрен реагирует как электрофильная частица [3].

Таким образом, совокупная модификация мишени включает в себя несколько типов повреждений: ковалентное присоединение адреса к мишени, дающее щелочеллабильные и щелочестабильные продукты; скрытую модификацию, не приводящую к ковалентному присоединению и проявляющуюся после щелочной (пиперидиновой) обработки. Щелочеллабильные продукты ковалентного присоединения, в свою очередь, делятся на две группы: к первой относятся продукты сшивки, которые под действием пиперидина разрушаются с разрывом сахарофосфатного остова в тех местах, где повреждены гетероциклические основания; ко второй относятся продукты, которые под действием пиперидина разрушаются с разрывом связи мишень-реагент и, таким образом, регенерируют исходную мишень.

Полученные в настоящей работе результаты показывают, что реагенты (I) и (II) вызывают разные типы модификации: для реагента (I) характерно образование продуктов ковалентного присоединения реагента к мишени, а для реагента (II) — скрытая модификация. Кроме того, определенному виду гетероциклического основания присущ тот или иной тип модификации: пиримидинам — скрытая модификация, а пуринам — образование ковалентных аддуктов. Выше были высказаны предположения о возможных реакциях, протекающих при фотомодификации мишеней реагентами (I) и (II); для того чтобы определить, по каким положениям гетероциклических оснований происходит модификация, необходимы дополнительные исследования.

Суммарная степень модификации реагентом (I) с учетом скрытого повреждения мишеней составляет 60–75%. Фотореагент (II) оказался существенно менее эффективным, чем реагент (I), особенно в отношении выхода ковалентных аддуктов (приблизительно в 3 раза); суммарное количество ковалентных сшивок и скрытой модификации достигает 25–50%.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что использование олигонуклеотидных реагентов, содержащих ароматические азиды различного строения, дает возможность проводить нуклеозид-специфическую модификацию нуклеиновых кислот. Для высокоэффективной комплексно адресованной фотомодификации нуклеиновых кислот наиболее перспективны перфторированные ароматические азиды, генерирующие в основном синглетный нитрен при облучении УФ-светом и приводящие к ковалентному присоединению преимущественно по гуаниновому остатку мишени.

Экспериментальная часть

В работе использовали олигонуклеотиды, синтезированные фосфитамидным или Н-фосфонатным методом на синтезаторе «Виктория-6М» [11]. Олигонуклеотиды, содержащие ароматическую азидогруппу при С5-атоме дезоксиуридина, получали в соответствии с работой [12]. Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов (ϵ) рассчитывали по методу [13]. Значения ϵ для гептануклеотидов, содержащих арилазидогруппу, считала равными сумме значений ϵ для немодифицированного гептануклеотида и амида соответствующей азидобензойной кислоты. Данные приведены в табл. 2. N-Оксисукцинимидные эфиры *n*-азидобензойной, 2-нитро-5-азидобензойной и *n*-азидотетрафторбензойной кислот получали в соответствии с работой [14].

Коэффициенты молярного поглощения (ϵ) для используемых олигонуклеотидов и их производных

Олигонуклеотид	Шифр	$\epsilon_{260} \cdot 10^{-3}, \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
TAAGTGGAGTTTGGC	(M-G)	146
TAAGTGGAAAAAAA	(M-A)	179
TAAGTGGATTTTTTT	(M-T)	141
TAAGTGGACCCCCC	(M-C)	138
TCCACTT		58
$\text{UCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOR}^1\text{C}^2\text{CACTT}$	(I)	73
$\text{UCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOR}^2\text{C}^1\text{CACTT}$	(II)	64
$\text{UCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOR}^3\text{C}^1\text{CACTT}$	(III)	61

Фотомодификация олигонуклеотидов-мишеней [1]. Образец (10 мкл), содержащий $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -меченый пентануклеотид ($5 \cdot 10^{-6}$ М) и соответствующий азидосодержащий гептануклеотид ($5 \cdot 10^{-6}$ М) в буфере, содержащем 0,16 М NaCl, 0,02 М Na_2HPO_4 , 0,1 мМ EDTA (рН 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 $W_{303-365} = 5 \cdot 10^{-4}$ Вт·см $^{-2}$. Время экспозиции в случае реагентов (I) и (III) – 5 мин, в случае реагента (II) – 3 мин.

Анализ продуктов модификации. После облучения реакционную смесь делили на две равные части, одну из которых обрабатывали 10% водным пиперидином (30 мин, 100°C); обе части осаждали раствором 2% LiClO_4 в ацетоне и анализировали с помощью гель-электрофореза в 20% акриламидном геле (8 М мочевины, 0,05 М трис-борат, рН 8,3, 1 мМ EDTA). Денситометрические профили дорожек радиоавтографа получали, используя лазерный сканер (LKB Ultrascan XL, Швеция). Выход продуктов ковалентного присоединения реагента к мишени (табл. 1) определяли по формуле $[I_B / (I_A + I_B)] \cdot 100\%$, где I_A и I_B – площади пиков на денситограммах, соответствующих фракциям А и Б на рис. 1. Степень модификации после обработки пиперидином (табл. 1) определяли по формуле $[(\Sigma I - I_M) / \Sigma I] \cdot 100\%$, где I_M – площадь пика непрореагировавшей мишени и ΣI – суммарная площадь всех пиков денситограммы, соответствующей одной из дорожек радиоавтографа на рис. 2.

На рис. 3 приведены гистограммы, полученные при обсчете денситограмм, соответствующих радиоавтографу на рис. 2. Степень модификации по данному положению мишени определяли как отношение площади пика на денситограмме для соответствующей полосы к суммарной площади всех пиков (%). Так же определяли количество щелчестабильных продуктов (рис. 3). На гистограммах приведены значения степени модификации, равные или превышающие 5%.

Фракции А и Б (рис. 1) выделяли с геля элюцией 0,3 М раствором LiClO_4 , содержащим 0,5% тритона X-100; затем каждую фракцию обрабатывали пиперидином и подвергали гель-электрофорезу как описано выше. Количество вещества в каждой полосе определяли в процентах как описано для рис. 3. На рис. 4 показана относительная модификация по различным положениям мишеней для фракций А и Б.

В работе использовали акриламид и N,N' -метиленисакриламид (Serga, ФРГ).

Авторы выражают благодарность Д. В. Пышному и М. В. Березовскому за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. 540-549.
2. Young M.-J. T., Platz M. S. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 17. P. 2199-2203.
3. Saundararajan N., Platz M. S. // J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 2034-2044.
4. Починок А. В., Починок В. Я., Авраменко Л. Ф., Кондратенко П. А., Скопенко В. Н., Назорный В. И., Чибисова Н. П. // Укр. хим. журн. 1979. Т. 45. № 42. С. 1204-1211.
5. Leyva E., Munoz M. S., Platz M. S. // J. Org. Chem. 1989. V. 55. № 25. P. 5938-5945.
6. Keana J.-F. W., Cai S. X. // J. Org. Chem. 1990. V. 55. № 11. P. 3640-3647.
7. Nielsen P. E., Jeppesen C., Egholm M., Buchardt O. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 3877-3888.
8. Nielsen P. E. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 122. P. 283-289.
9. Praseuth D., Chassignol M., Takasugi M., Doan T. L., Thuong N. T., Helene C. // J. Mol. Biol. 1987. V. 196. P. 939-942.
10. Doan T. L., Perronault L., Praseuth D., Nabholz N., Decout J.-L., Thuong N. T., Lhomme J., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 9. P. 7749-7758.
11. Веньяминова А. Д., Горн В. В., Зенкова М. А., Комарова В. Ф., Репкова М. Н. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 16. С. 941-950.
12. Зарытова В. Ф., Комарова Н. И., Левина А. С., Лохов С. А., Табатадзе Д. Р., Халижская Л. М., Александрова Л. А. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1059-1065.
13. Cantor C. R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65-77.
14. Добриков М. И., Приходько Т. А., Сафронов И. В., Шишкин Г. В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18-23.

Поступила в редакцию
17.III.1991

После доработки
7.IV.1992

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

SITE-SPECIFIC PHOTOMODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY ARYLAZIDE AND PERFLUORO ARYLAZIDE DERIVATIVES OF OLIGONUCLEOTIDES. II. STUDY OF NUCLEOSIDE-SPECIFICITY OF MODIFICATION

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

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

Oligonucleotide reagents bearing aromatic azido groups of different structures were shown to be suitable for nucleoside specific photomodification of nucleic acids. Modification of the pentadecanucleotide targets d(TAAGTGGAGTTTGGC), d(TAAGTG-GAAAAAAAAA), d(TAAGTGGACCCCCC) and d(TAAGTGGATTTTTTTT) was investigated with reagents d(UCH₂OCH₂CH₂NHCO⁺CCACTT) carrying a photoactive group R(R¹ - *n*-azido-2-tetrafluorophenyl - reagent (I), R² - 2-nitro-5-azidophenyl - reagent (II) and R³ - *n*-azidophenyl - reagent (III)) at C-5-modified deoxyuridine. Photomodification did not exceed 5% for the targets in case of reagent (III); the modification extent was 25-50% depending on the target sequence for reagent (II); reagent (I) with perfluoro azido group was the most effective, that provided 60-70% of modification. Reagents (I) and (II) were found to be sensitive to the nucleoside sequence of the target: the most vulnerable sites for reagent (I) and (II) were guanine and cytosine residues, respectively. These bases were modified predominantly when being adjacent to the addressed site of the target.