



УДК 547.963.32.07:577.113.6:554

ФОТОАФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В КОМПЛЕМЕНТАРНОМ КОМПЛЕКСЕ

© 1995 г. Т. С. Годовикова[#], М. В. Березовский*, Д. Г. КнорреНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8;* Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2
Поступила в редакцию 15.09.94 г. После доработки 17.07.95 г.

Изучено внутрикомплексное фотохимическое взаимодействие фотоактивных производных R-CONH(CH₂)₃NH-pGATACCAA, где R = *n*-азидотетрафторфенил (I) или 2-нитро-5-азидофенил (II) и 5'-фосфо-*n*-азидоанилида pGATACCAA (III) с мишенью – олигонуклеотидом *pGGTATCp (IV) и его производными *pGGTATCp-NH(CH₂)₃NHX, где X = H (V), Phe (VI) или Lys (VII). По данным электрофореза, фотореагент (I) образует ковалентные фотоаддукты как с соединением (IV), так и с производными (VI) - (VII). В случае реагента (II) фотосшивка наблюдается только с мишенями (V) - (VII), включающими в себя алифатические аминогруппы. При облучении дуплексов, образованных фотореагентом (III) с мишенями (V) - (VII), процесс сопровождается отщеплением олигонуклеотидного фрагмента реагента от продукта фотомодификации. Обсуждается возможный механизм данного отщепления.

Ключевые слова: производные олигонуклеотидов, фотоаффинная модификация, ароматические азиды, производные аминокислот.

Производные олигонуклеотидов, несущие реакционноспособные группы, нашли широкое применение для специфической модификации нуклеиновых кислот в районе участков мишени, комплементарных олигонуклеотиду [1], и в качестве аффинных реагентов для модификации белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами [2]. Уже накоплен значительный материал по специфической модификации такими производными ферментов, катализирующих биосинтез нуклеиновых кислот – ДНК- и РНК-полимераз [3, 4], белков в составе рибосом [5] и хроматина [6], специфических мембранных рецепторов [7] (например, белка CD4, ответственного за первичное взаимодействие Т-лимфоцитов с вирусом иммунодефицита человека [8]), некоторых белков сыворотки крови [9].

Наиболее перспективным представляется использование функциональных групп, способных к фотохимической модификации мишени, поскольку, во-первых, они, как правило, инертны в отсутствие облучения и могут быть активированы только после формирования специфических комплексов, а во-вторых, их активация может

быть осуществлена за очень короткое время, что открывает перспективу исследования динамики процессов, происходящих при белково-нуклеиновом узнавании. Среди соединений с такими группами большой интерес вызывают ароматические азиды, которые при фотолизе генерируют активные нитрены [10]. Однако, несмотря на большое число работ с использованием фотоаффинных реагентов на основе различных азидов, до сих пор не проводилось систематического исследования фотоактивных групп для модификации белков с целью оптимизации структуры таких реагентов. Мало внимания уделялось также изучению продуктов аффинной модификации – определялись только природа и локализация поврежденного аминокислотного остатка [11].

Настоящая работа посвящена сопоставлению модифицирующих свойств олигонуклеотидных производных трех ароматических азидов, часто используемых при создании реакционноспособных производных олиго- и мононуклеотидов – *n*-азидоанилина, *n*-азидотетрафтор- и 2-нитро-5-азидобензойных кислот [1, 2]. Эти фотореагенты существенно различаются по фотохимическим свойствам, поскольку при облучении УФ-светом они генерируют разные активные промежуточные частицы: для *n*-азидотетрафторбензоильного остатка характерно образование синглетного

Используемые сокращения: *р – [³²P]фосфат. Префикс "d" ("дезокс") в аббревиатуре олигодезоксинуклеотидов и их производных опущен.

[#] Автор для переписки.

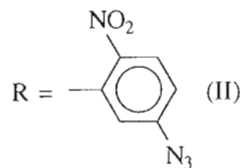
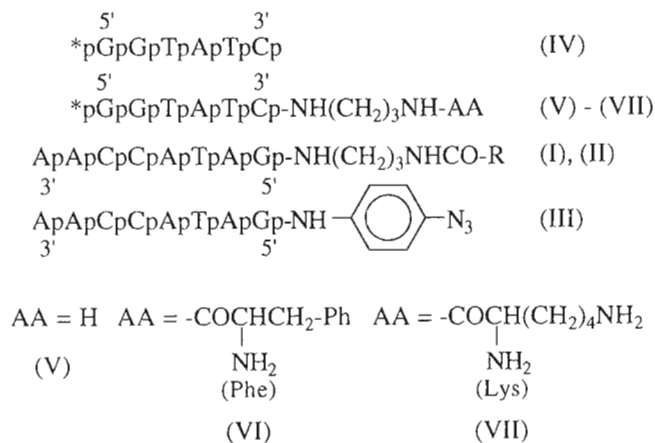


Схема 1.

нитрена [12, 13], для 2-нитро-5-азидобензоильного – триплетного [14]. Образующийся при облучении *n*-азидоанилина и его производных нитрен в водных растворах практически мгновенно превращается в производные *n*-бензохинондиимина [15, 16].

Мы использовали специальную модельную систему, позволяющую проводить сравнительный анализ внутрикомплексного взаимодействия арилизидных производных олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами и с функциональными группами белков. Модель состоит из производных двух комплементарных олигонуклеотидов, одно из которых является реагентом, а другое – мишенью модификации (схема 1). У реагента к 5'-концевому фосфату непосредственно или через спейсер присоединена арилизидная группа. У мишени к 3'-концевому фосфату олигонуклеотида (IV) через 1,3-диаминопропановый спейсер присоединен аминокислотный остаток.

Среди аминокислот выбраны фенилаланин и лизин, которые нередко участвуют в белково-нуклеиновых взаимодействиях. Кроме того, ε-аминогруппа лизина в щелочной среде может играть роль сильного нуклеофильного центра.

Ранее [16, 17] нами было показано, что в ходе облучения *n*-азидоанилин и γ-*n*-азидоанилид АТР превращаются в *n*-бензохинондиимин и γ-*n*-бензохинониминоимид АТР, которые быстро и количественно взаимодействуют с соединениями, имитирующими функциональные группы белков: β-меркаптоэтанолом, изопропиламином, имидазолом. В настоящей работе показано, что анало-

гичные превращения происходят с лизином. Из изменения УФ-спектра *n*-азидоанилина в ходе облучения в воде (рис. 1) видно, что в процессе фотолитиза накапливается продукт с характерным для *n*-бензохинондиимина разрешенным спектром в УФ-области [17]. Добавление к облученному раствору 1 М раствора лизина приводит к быстрому исчезновению *n*-бензохинондиимина и образованию за 2.5 мин продукта с совершенно другим спектром. Такой же спектр регистрируется при облучении раствора, содержащего одновременно *n*-азидоанилид и 1 М лизин (рис. 1, 2). Идентификация продукта превращения лизина в данной работе не предусматривалась и будет предметом дальнейших исследований.

Соединение (V) синтезировали из олигонуклеотида и 1,3-диаминопропана согласно [18]. Производные (VI) и (VII) получали ацилированием конъюгата (V) по алифатической аминогруппе N-оксисукцинимидными эфирами соответствующих аминокислот с защищенными остатком SOCF₃ аминокислотами. После ионообменной хроматографии аминокислоты деблокировались 12% водным аммиаком и конечный продукт очищался хроматографией на смоле с обращенной фазой. Соединения (I) и (II) получали аналогичным образом из олигонуклеотида, в который 1,3-диаминопропановый спейсер был введен по 5'-концевому фосфату. Бензоилирование проводилось с помощью N-оксисукцинимидных эфиров соответствующих азидобензойных кислот.

Соединение (III) получали фосфорилированием *n*-азидоанилина фосфо-N-метилимидазолидом

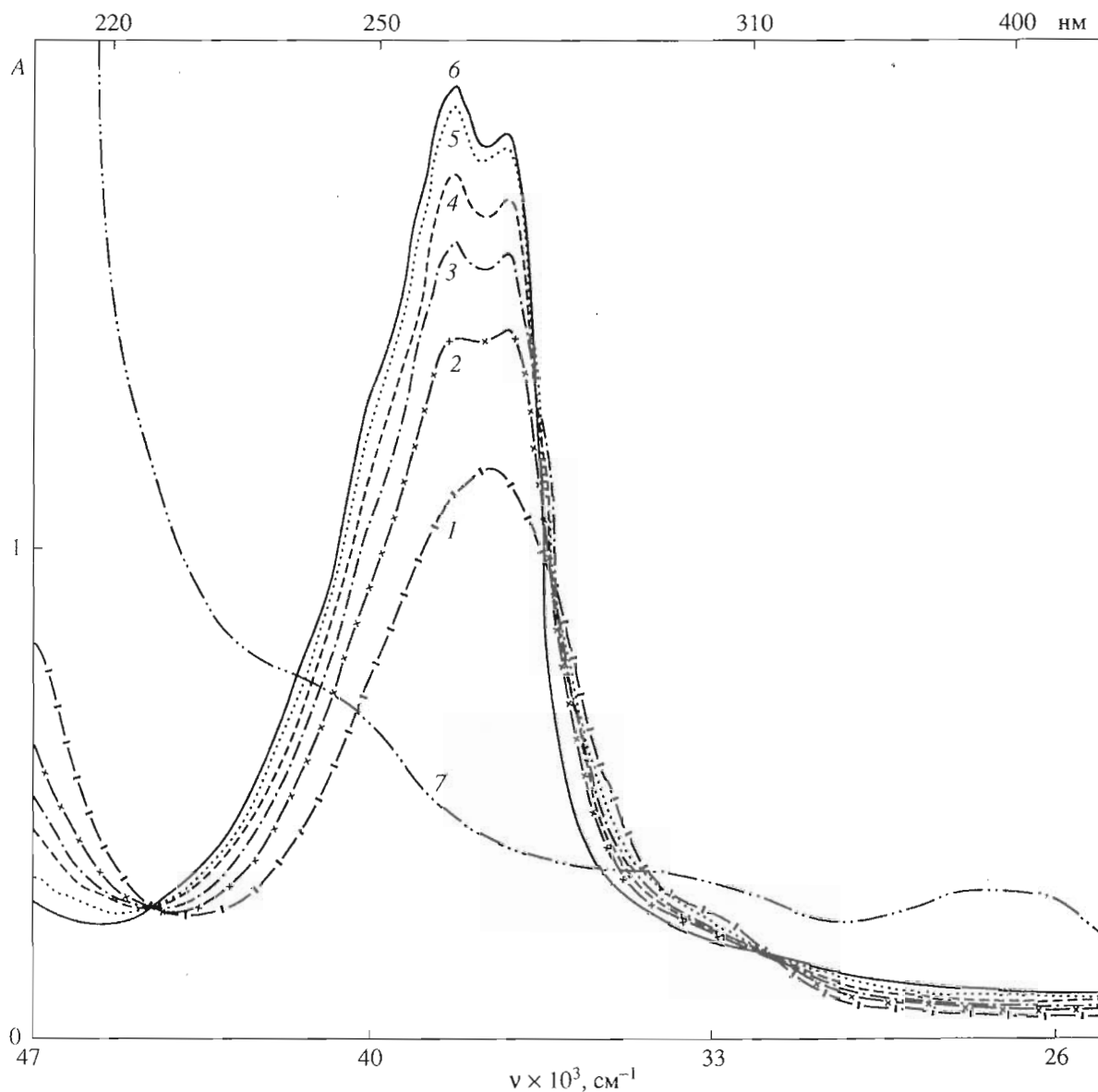


Рис. 1. Электронные спектры поглощения в воде 10^{-5} М *n*-азидоанилина (1) и реакционной смеси, образующейся при его облучении светом λ 303 - 365 нм в течение 20 (2), 40 (3), 60 (4), 120 (5), 180 с (6); через 2 мин после добавления к смеси (6) 1 М водного раствора *L*-лизина (7). Интенсивность света 1.2×10^{15} квант $\text{с}^{-1} \text{см}^{-2}$.

олигонуклеотида в соответствии с работой [18]. Чтобы предотвратить восстановление азидогруппы в присутствии трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида, *n*-азидоанилин добавляли к фосфо-*N*-метилимидазолу олигонуклеотида после выделения последнего из реакционной смеси путем осаждения в эфир.

Производные (II) - (VII) индивидуальны по данным ионообменной хроматографии и высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Превращение олигонуклеотидов в фосфамиды через промежуточные фосфо-*N*-метилимидазолы и обработка фосфамидов олигонуклеотидов *N*-оксисукцинимидными эфирами, как неод-

нократно показано ранее (см., например, [19]), не приводят к каким-либо повреждениям олигонуклеотидной части. Об отсутствии таких повреждений свидетельствует также совпадение УФ-спектров полученных производных в области до 300 нм со спектрами исходных олигонуклеотидов. В спектре соединения (II) наблюдается характерное плечо с максимумом 334 нм, что указывает на присоединение к олигонуклеотиду остатка 2-нитро-5-азидобензойной кислоты. О наличии в производных (I) - (III) гидрофобных арилазидных остатков свидетельствует тот факт, что производные (I) и (II) элюируются с обращенной фазы при более высокой концентрации ацетонитрила по

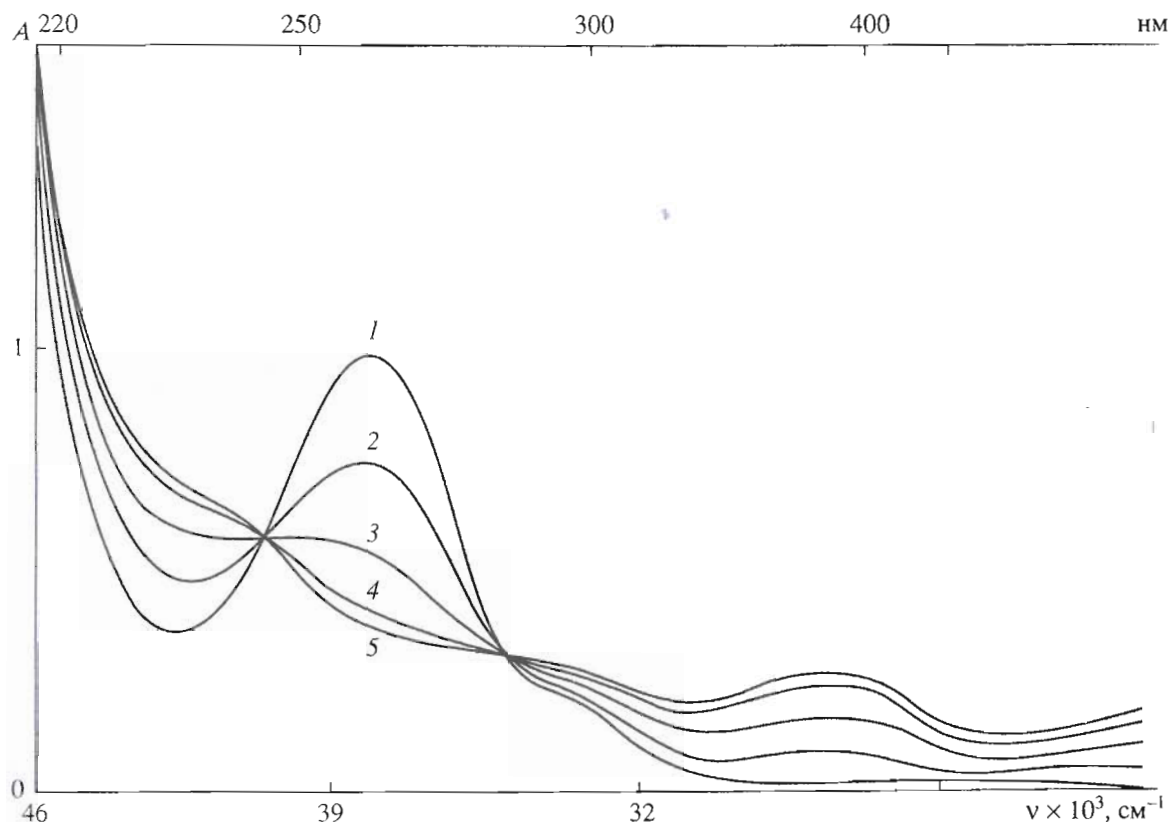


Рис. 2. Электронные спектры поглощения 10^{-5} М *l*-азидоанилина в 1 М водном растворе *L*-лизина (1) и реакционной смеси, образующейся при его облучении светом λ 303 - 365 нм в течение 20 (2), 50 (3), 110 (4), 170 с (5). Интенсивность света 1.2×10^{15} квант $\text{с}^{-1} \text{см}^{-2}$.

сравнению с соединением (V), а производное (III) – по сравнению с олигонуклеотидом. В ИК-спектрах соединений (I) - (III) наблюдается характерная для азидогруппы полоса поглощения в области $2140 - 2240 \text{ см}^{-1}$.

Введение в соединение (V) по аминогруппе спейсера N-защищенных аминокислотных остатков должно привести к увеличению суммарного отрицательного заряда. Действительно, после ацилирования наблюдается увеличение времени удерживания продуктов на анионообменной смоле. После удаления трифторацетильных защитных групп обработкой соединений водным раствором аммиака время выхода олигонуклеотидных производных (VI) и (VII) со смолы уменьшается в соответствии с изменением суммарного заряда у соединения (VI) на +1 и у производного (VII) на +2.

Температура плавления (т. пл.) исследуемых комплементарных комплексов, оцененная согласно работе [20] по формуле $4n_{\text{GC}} + 2n_{\text{AT}} - 3$ (n_{GC} и n_{AT} – количество соответствующих комплементарных пар), составляет 15°C . В связи с этим фотомодификацию проводили при 4°C в буфере, содержащем 0.16 М NaCl, 0.02 М Na_2HPO_4 , 0.1 мМ EDTA (pH 9), при концентрации производных (IV) - (VII)

(мишени) 10^{-6} М. Чтобы обеспечить большую степень превращения мишени в комплекс, использовали 10-кратный избыток (10^{-5} М) реагентов (I) - (III). Облучение проводили светом (λ 303 - 365 нм) с интенсивностью 1.2×10^{15} квант $\text{с}^{-1} \text{см}^{-2}$ в течение 2.5 мин. При температуре выше т. пл. (25°C) никаких превращений мишени в процессе облучения не наблюдали, что свидетельствует о внутрикомплексном характере всех описываемых ниже реакций.

Реакционные смеси после облучения анализировали с помощью гель-электрофореза (рис. 3, 4). Радиоактивную метку на 5'-конец олигонуклеотида (IV) и его производных (V) - (VII) вводили путем прямого кинирования с использованием полинуклеотидкиназы фага T4 и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

Фотомодификация олигонуклеотида (IV) наблюдается только в случае реагента, несущего *l*-азидотетрафторбензоильный остаток (рис. 3а, 2). Подвижность наблюдаемой новой полосы существенно меньше, чем у исходного олигонуклеотида, что указывает на образование ковалентного аддукта (продукта сшивки двух производных олигонуклеотидов). Аналогичные результаты были получены авторами [19] при исследовании

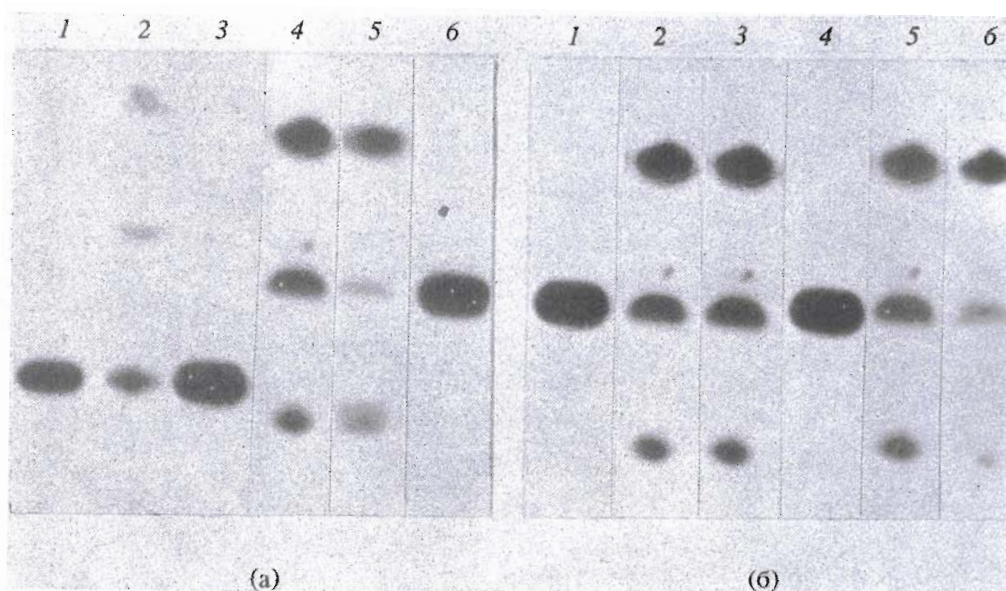


Рис. 3. Гель-радиоавтограф продуктов внутрикомплексных фотореакций реагентов (I) и (II) с немодифицированным олигонуклеотидом (IV) и его производными (V) - (VII). (а) - необлученные: 1 - (IV) · (I), 6 - (V) · (I); облученные: 2 - (IV) · (I), 3 - (IV) · (II), 4 - (V) · (I), 5 - (V) · (II). (б) - необлученные: 1 - (VII) · (I), 4 - (VI) · (I); облученные: 2 - (VII) · (I), 3 - (VII) · (II), 5 - (VI) · (I), 6 - (VI) · (II). Условия экспериментов см. "Эксперимент. часть".

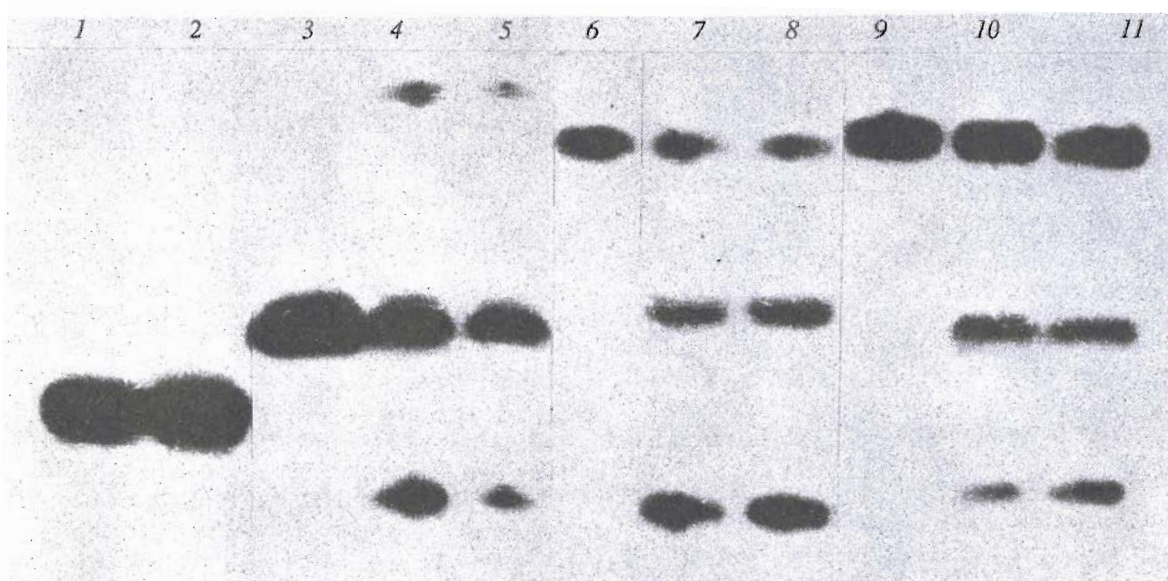


Рис. 4. Гель-радиоавтограф продуктов внутрикомплексных фотореакций реагента (III) с немодифицированным олигонуклеотидом (IV) и его производными (V) - (VII). Без облучения: 1 - (IV) · (III), 3 - (V) · (III), 6 - (VII) · (III), 9 - (VI) · (III); облученные: 2 - (IV) · (III), 4 - (V) · (III), 7 - (VII) · (III), 10 - (VI) · (III). Предварительно облученный (III) добавлен к (IV) (5), (VII) (8), (VI) (11). Условия экспериментов см. "Эксперимент. часть".

фотомодификации олигонуклеотидной мишени другого состава в комплементарном комплексе с такого типа реагентом. При фотомодификации реагентом (I) мишеней (V) - (VII), содержащих аминокспейсер или аминокислотный остаток, количество продуктов ковалентного присоединения значительно увеличивается (рис. 3а, 4, рис. 3б, 2 и 5). Существенное количество продуктов сшивки на-

блюдается при облучении мишеней (V) - (VII) с реагентом (II) (рис. 3а, 5, рис. 3б, 3 и 6). Кроме того, появляется некоторое количество продуктов с большей электрофоретической подвижностью.

Данные для реагента (III), содержащего остаток *n*-азидоанилина, приведены на рис. 4. Образование продукта сшивки наблюдается лишь при облучении комплекса с мишенью (V) (дорожка 4).

Основные продукты фотомодификации мишеней (V) - (VII) имеют по сравнению с исходной мишенью большую электрофоретическую подвижность (дорожки 4, 7, 10). Электрофореграммы практически идентичны в случае, когда мишени добавлялись в предварительно облученный реагент (III) (дорожки 5, 8, 11). Это свидетельствует (в соответствии с ранее изученными свойствами *n*-азидоанилина и его производных [16, 17]) о том, что модификация мишеней при облучении комплексов с реагентом (III) осуществляется *n*-бензохинониминоимидным производным, которое образуется в результате фотопревращения реагента (III).

Количественное распределение продуктов модификации определяли по денситометрическим профилям дорожек радиоавтографа.

Из таблицы видно, что введение в олигонуклеотидную мишень аминокислотных остатков вызывает заметное увеличение эффективности ее модификации. При этом в случае реагентов (I) и (II) среди продуктов фотореакции преобладают ковалентные аддукты реагентов с мишенью. При фотомодификации мишеней производным *n*-азидоанилина выявляются соединения, в которых, судя по их электрофоретической подвижности, отсутствует олигонуклеотидная часть реагента. Это можно объяснить, если учесть, что промежуточный *n*-бензохинониминоимид олигонуклеотида может вступать в реакцию с нуклеофильными группами с образованием продуктов как 1,4-, так и 1,2-присоединения (соответственно пути *a* и *б* на схеме 2). При реализации пути *б* должно происходить отщепление олигонуклеотидного остатка реагента.

Образование продуктов 1,2-присоединения ранее описано для случая взаимодействия *N,N*-бис-(фенилсульфонил)-*n*-бензохинондиимина с аминами. При взаимодействии с анилином на первой

Результаты модификации фотореагентами (I) - (III) олигонуклеотидных мишеней

Мишень	Выход продуктов* (%) с реагентами					
	(I)		(II)		(III)	
	A	Б	A	Б	A	Б
(IV)	23	0	0	0	0	0
(V)	47	24	27	21	17(14)**	30(19)**
(VI)	52	16	39	8	0(0)**	51(53)**
(VII)	54	17	46	9	0(0)**	39(43)**

* А – ковалентные аддукты, Б – продукты с увеличенной электрофоретической подвижностью.

** Эксперименты, в которых ³²P-меченую мишень добавляли к предварительно облученному *n*-азидоанилиду олигонуклеотида.

стадии происходит 1,2-присоединение с отщеплением обоих фенилсульфаниламидных остатков, после чего в результате последовательных 1,4-присоединения, окисления и повторного 1,4-присоединения образуется 2,5-дизамещенное производное *n*-фенилендиамина. С первичным алифатическим амином (например, *n*-бутиламином) происходит только 1,2-присоединение по сульфонилиминогруппам с последующим отщеплением сульфонил-амида [21]. Аналогичные реакции с отщеплением остатка нуклеозид-5'-трифосфата наблюдались при проведении фотомодификации ДНК-полимеразы из *E. coli* γ -*n*-азидоанилидом dGTP [22].

Обращает на себя внимание тот факт, что при облучении комплексов аминокислотных производных с реагентом (III) основной продукт модификации имеет ту же электрофоретическую подвижность, что и соединение (V). Более того, совпадают по положению в геле и дополнительные продукты с более высокой подвижностью. Это

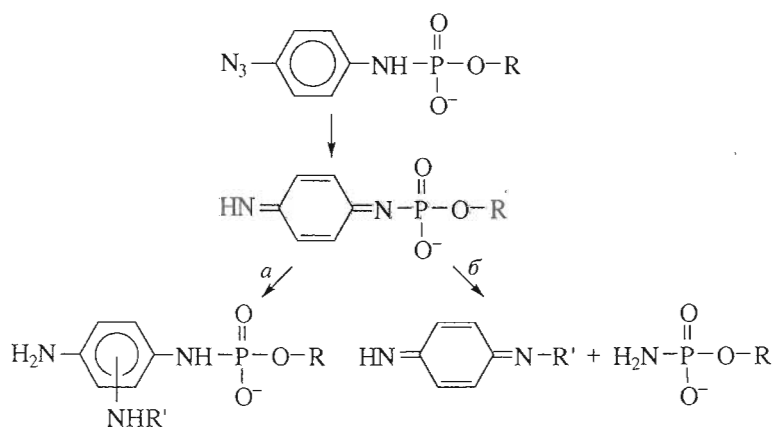


Схема 2.

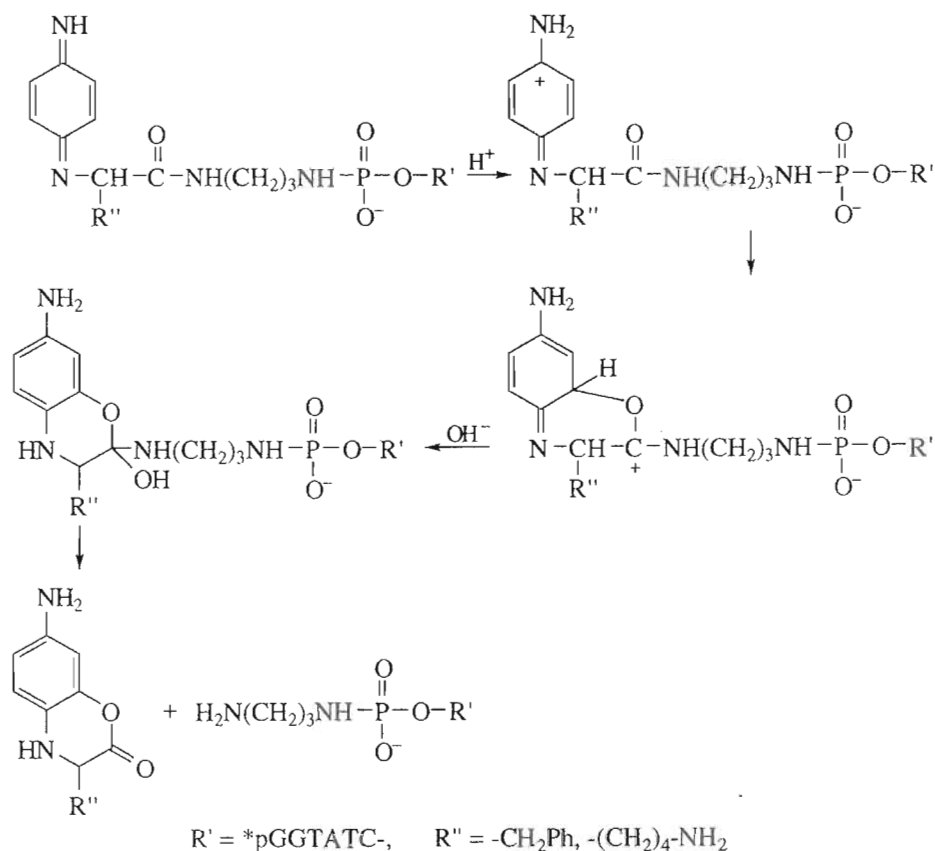


Схема 3.

может рассматриваться как указание на превращение в ходе фотомодификации аминокислотных производных в производное 1,3-диаминопропана (V), т.е. на отщепление аминокислотного фрагмента. Такое превращение, если оно подтвердится прямыми экспериментами, может быть объяснено внутримолекулярной атакой карбонильной группы аминокислотного остатка на электрофильный центр фрагмента *n*-бензохинондиимина с одновременным разрывом амидной связи (схема 3).

Образование соответствующего оксазола наблюдали авторы [21] при добавлении HCl к 2,6-дихлор-*n*-бензохинондипивалоиламиду.

Из полученных данных видно, что олигонуклеотидные производные *n*-азидоанилина в качестве реагентов для модификации белков обладают некоторыми преимуществами по сравнению с производными типа (I) и (II). Основное из этих преимуществ – отщепление в ходе модификации олигонуклеотидной части, что приводит к меньшим изменениям хроматографических и электрофоретических характеристик биополимера. Это в ряде случаев облегчает идентификацию, но, с другой стороны, исключает возможность использовать радиоактивную метку ^{32}P в олигонуклеотиде и требует для радиохимической детекции

синтеза функциональной группы, меченной ^{14}C или 3H .

Нам представляется, что использованный в данной работе прием, основанный на сближении исследуемых реакционноспособных групп путем присоединения их к комплементарным олигонуклеотидам, может оказаться удобным в тех случаях, когда необходимо провести скрининг функциональных групп, намечаемых к использованию в составе аффинных реагентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы *N*-метилимидазол, трифенилфосфин, *N,N*-диметиламинопиридин (Fluka, Швейцария); 2,2'-дипиридилдисульфид (Aldrich, США); акриламид, *N,N*-метиленабисакриламид, трифторуксусный ангидрид, *L*-лизин, *L*-фенилаланин (Serva, ФРГ); цетилтриметиламмоний-бромид, активированный уголь (Merck, ФРГ); *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, трис-HCl (Sigma, США). Этиловый эфир трифторуксусной кислоты готовили по методике, описанной в работе [23]; *N*-оксисукцинылфосфиры *n*-азидотетрафторбензойной и 2-нитро-5-азидобензойной кислот получены согласно [24]; *n*-азидоанилин (производство

ОХП НИОХ СО РАН), дополнительно перекристаллизовывали из смеси вода-этанол.

Олигодезоксинуклеотиды GGTATCp и pGATACAA синтезированы фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе, как описано в работе [25]. Цетилтриметиламмонийные соли олигонуклеотидов получены согласно [26].

Остаток 1,3-диаминопропана (линкер) присоединяли к концевому фосфату олигонуклеотида в соответствии с работой [18].

n-Азидотетрафторбензоильную и 2-нитро-5-азидобензоильную группы вводили в аминоклинкер в составе олигонуклеотида так, как описано в работе [19].

Тонкослойную хроматографию на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, Чехо-Словакия) и Kieselgel (Merck, ФРГ) проводили в системах растворителей: бензол-ацетон-уксусная кислота, 50 : 25 : 1 (А); хлороформ-метанол, 4 : 1 (Б).

Визуализацию соединений, поглощающих в УФ-свете, на силикагельных пластинах проводили при λ 254 нм, положение остальных органических соединений детектировали по образованию окрашенных пятен в парах иода, аминоклиппы – по реакции с нингидрином (2% раствор в метаноле, 1% уксусная кислота).

ВЭЖХ осуществляли на хроматографах Altex-332 и Waters 600E (США) на колонках размером 4.6 × 250 мм; скорость элюции 2 мл/мин. Для анионообменной хроматографии использовали Полисил-СА (НПО "Вектор"), градиент – 0 - 0.3 М KH_2PO_4 (рН 6.5) в 20% ацетонитриле за 90 мин. Колоночную хроматографию на смоле с обращенной фазой LiChrosorb-RP18 (Merck, ФРГ) проводили в градиенте 0 - 20% ацетонитрила в 0.05 М LiClO_4 за 30 мин.

УФ-спектры регистрировали с помощью спектрофотометра Record M-40 (Karl Zeiss, ГДР), ИК-спектры – с помощью спектрофотометра M-60 (Karl Zeiss, ГДР).

Денситометрию профилей дорожек радиавтографа проводили на лазерном сканере Ultrascan XL (ЛКВ, Швеция).

Образцы облучали светом лампы ДРШ-1000 через комбинацию стеклянных фильтров УФС-1, БС-12. Интенсивность света 1.2×10^{15} квант $\text{с}^{-1} \text{см}^{-2}$. Концентрация образцов 10^{-6} - 10^{-5} М. Фотомодификацию проводили в 0.16 М NaCl, 0.02 М Na_2HPO_4 , 0.1 мМ EDTA, рН 9.

Радиоактивную метку на 5'-конец олигонуклеотида вводили путем прямого кинирования с использованием полинуклеотидкиназы фага T4 и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов ϵ рассчитывали по методу [27] с учетом значений ϵ для нуклеотидов [28]. Значение ϵ для модифицированных олигонуклеотидов счита-

ли равным сумме значений ϵ_{260} для немодифицированного олигонуклеотида и амида соответствующего арилазида и аминокислоты (при λ 260 нм).

N-Трифторацетилфенилаланин получали обработкой *L*-фенилаланина (330.4 мг, 2 ммоль) трифторуксусным ангидридом (305 мкл, 2.2 ммоль) в хлороформе (4 мл) в течение 2 ч при 20°C. Реакцию контролировали с помощью ТСХ в системе А. По завершении реакции раствор упаривали досуха. Продукт перекристаллизовывали из хлороформа. Т. пл. 118.5 - 120.5°C (лит. данные [29]: т. пл. 119.4 - 120.6°C). Выход 88%. Вещество гомогенно по данным ТСХ. R_f 0.33 (А), 0.55 (Б).

N-Оксисукцинимидный эфир N-трифторацетилфенилаланина получали конденсацией N-трифторацетилфенилаланина (261 мг, 1 ммоль) с N-гидроксисукцинимидом (126 мг, 1.1 ммоль) в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (226 мг, 1.1 ммоль) в 4 мл дихлорметана. Реакцию проводили при 20°C в течение 24 ч. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали. Белый осадок суспендировали в эфире, отфильтровывали, промывали эфиром (4 × 2 мл). Выход продукта 90%. Вещество гомогенно по данным ТСХ. R_f 0.45 (А), 0.66 (Б). Гидролиз соединения в течение 2 ч в воде при 56°C приводит, по данным ТСХ, к образованию N-гидроксисукцинимиды и N-трифторацетилфенилаланина.

N^α,N^ε-бис(трифторацетил)лизин получали обработкой *L*-лизина (73 мг, 0.5 ммоль) этиловым эфиром трифторуксусной кислоты (143 мкл, 1.2 ммоль) в диоксане (4 мл) в течение 15 ч при 50°C. Раствор упаривали досуха. Продукт перекристаллизовывали из смеси эфир-этилацетат. Выход 70%. Соединение гомогенно по данным ТСХ. R_f 0.35 (А).

N-Оксисукцинимидный эфир N^α,N^ε-бис(трифторацетил)лизина получали конденсацией N^α,N^ε-бис(трифторацетил)лизина (241 мг, 1 ммоль) с N-гидроксисукцинимидом (126 мг, 1.1 ммоль) в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (226 мг, 1.1 ммоль) в 4 мл дихлорметана. Реакцию проводили 24 ч при 20°C. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали. Белый осадок суспендировали в эфире, отфильтровывали, промывали эфиром (4 × 3 мл). Выход продукта 85%. Вещество гомогенно по данным ТСХ. R_f 0.55 (А). Гидролиз продукта реакции в течение 2 ч в воде при 56°C приводит к образованию N-гидроксисукцинимиды и N^α,N^ε-бис(трифторацетил)лизина.

5'-Фосфо-*n*-азидоанилид олигонуклеотида (соединение III) синтезировали из 20 ОЕ₂₆₀ цетавионовой соли олигонуклеотида, которую растворяли в 40 мкл DMSO. К раствору последовательно добавляли трифенилфосфин (18.3 мг, 70 мкмоль) в 30 мкл DMF, N-метилимидазол

(7.6 мкл, 70 мкмоль) и 2,2'-дипиридилдисульфид (15.4 мг, 70 мкмоль) в 30 мкл DMF; выдерживали 10 мин при 37°C. К реакционной смеси добавляли 1 мл эфира, осадок собирали центрифугированием, промывали эфиром (3 × 1 мл). К осадку в темноте добавляли *n*-азидоанилин (26.8 мг, 200 мкмоль) в 100 мкл DMF. Реакционную смесь инкубировали в темноте 12 ч при комнатной температуре, осаждали в 2% LiClO₄ в ацетоне, осадок собирали центрифугированием, промывали ацетоном и продукт выделяли ионообменной хроматографией с последующим обессоливанием на смоле с обращенной фазой LiChrosorb-RP18. Выход продукта 30 - 40%. В ИК-спектрах соединения (VII) наблюдается характерная для азидогруппы полоса поглощения в области 2140 - 2240 см⁻¹. УФ-спектр полученного производного олигонуклеотида практически совпадает со спектром исходного олигонуклеотида.

3'-{1-[3-(Фенилаланиламидо)пропил]}фосфамид и 3'-{1-[3-(лизиламидо)пропил]}фосфамид олигонуклеотида GGTATCp. К 5 OE₂₆₀ цетавлоновой соли GGTATCp-NH(CH₂)₃NH₂ в 15 мкл DMF добавляли раствор *N*-оксисукцинимидного эфира соответствующей аминокислоты (3 мкмоль в 20 мкл DMF) и *N,N*-диметиламинопиридина (1.5 мг, 12 мкмоль) в 15 мкл DMF. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при 37°C, осаждали в 2% LiClO₄ в ацетоне, осадок собирали центрифугированием, промывали ацетоном и продукт выделяли анионообменной хроматографией. Трифторацетильную защитную группу удаляли концентрированным NH₃ в течение 2 ч при 56°C. Конечный продукт выделяли ВЭЖХ на смоле с обращенной фазой.

Фотомодификация соединений (IV) - (VII) арилазидными производными олигонуклеотида (I) - (III). Образцы (20 мкл), содержащие 5'-³²P-меченые олигонуклеотид (IV) или его производные, несущие аминокислотный остаток (соединения (VI), (VII) или остаток 1,3-диаминопропана (соединение (V)) в концентрации 10⁻⁶ М и соответствующее арилазидное производное олигонуклеотида (соединения (I) - (III)) в концентрации 10⁻⁵ М в фосфатном буфере (рН 9), помещали в лунки планшета, охлаждали до 4°C и облучали светом ртутной лампы с расстояния 15 см. Время экспозиции 2.5 мин. В ряде экспериментов с 5'-фосфо-*n*-азидоанилидом олигонуклеотида на первой стадии облучали фотореагент (III) в отсутствие мишени, после чего добавляли соответствующее производное [5'-³²P]олигонуклеотида.

После облучения реакционную смесь выдерживали 1 ч в темноте при комнатной температуре, осаждали раствором 2% LiClO₄ в ацетоне, осадок собирали центрифугированием, промывали 85% этанолом в воде, ацетоном и анализировали с помощью гель-электрофореза в 20% полиакрил-

амидном геле (8 М мочевины, 0.05 М трис-борат (рН 8.3), 1 mM EDTA). Распределение вещества в дорожках геля определяли по денситометрическим профилям радиоавтографа. Степень фотомодификации определяли как отношение площади пиков, соответствующих продуктам модификации, к суммарной площади всех пиков на денситограмме (%).

Работа выполнена по гранту № 93-04-22059 Российского фонда фундаментальных исследований. Авторы благодарят Т.А. Приходько за разработку *N*-оксисукцинимидных эфиров *n*-азидотетрафторбензойной и 2-нитро-5-азидобензойной кислот, И.В. Цветкова за синтез олигонуклеотидов, В.Н. Сильникова за помощь при записи ИК-спектров, А.Д. Одинаева за помощь при получении денситометрических профилей дорожек радиоавтографа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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, Tokyo: CRC Press, 1994.
2. Knorre D.G. // Structural Tools for the Analysis of Protein-Nucleic Acid Complexes / Eds Lilley D.M.J., Heumann H., Suck D. Basel, Boston, Berlin: Birkhauser Verlag, 1992. P. 185 - 193.
3. Knorre D.G., Lavrik O.I., Nevinsky G.A. // Biochimie. 1988. V. 70. P. 655 - 661.
4. Godovikova T.S., Grachev M.A., Kutuyavin I.V., Tsarev I.G., Zarytova V.F., Zaychikov E.F. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 166. P. 611 - 616.
5. Vladimirov S.N., Babkina G.T., Venyaminova A.G., Gimaudinova O.I., Zenkova M.A., Karpova G.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1048. P. 245 - 256.
6. Chernolovskaya E.L., Kobets N.D., Borissov R.G., Abramova T.V., Vlassov V.V. // FEBS Lett. 1992. V. 303. P. 269 - 271.
7. Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Rye A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6454 - 6458.
8. Yakubov L., Khaled Z., Zhang L.-M., Truneh A., Vlassov V., Stein C.A. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 18818 - 18823.
9. Власов В.В., Паутова Л.В., Рыкова Е.Ю., Якубов Л.А. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1247 - 1251.
10. Patai S. The Chemistry of the Azido Group. L.: Intersci. Publ., 1971.
11. Knorre D.G., Vlassov V.V. Affinity Modification of Biopolymers. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1989.
12. Karlyn A., Russel P. // Bioconjugate Chem. 1993. P. 172 - 177.
13. Karlyn A., Platz S. // Bioconjugate Chem. 1993. P. 179 - 183.
14. Будыка М.Ф., Кантор М.М., Алфимов М.В. // Успехи химии. 1992. Т. 61. Вып. 1. С. 48 - 74.

15. Baetzold R.C., Tong L.K. // J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. P. 1347 - 1353.
16. Badashkeyeva A.G., Gall T.S., Efimova E.V., Knorre D.G., Lebedev A.V., Mysina S.D. // FEBS Lett. 1983. V. 155. P. 263 - 265.
17. Галль Т.С., Грицан Н.П., Мызина С.Д., Бажин Н.М., Немцева Е.В. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. С. 883 - 887.
18. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1246 - 1252.
19. 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. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 540 - 549.
20. Lion T., Haas O.A. // Anal. Biochem. 1990. V. 188. P. 335 - 337.
21. Adams R., Reifschneider W. // Bull. Soc. Chim. Fr. 1958. P. 23 - 65.
22. Кудряшова Н.В., Шаманина М.Ю., Годовикова Т.С., Ананько Е.А., Ахмадиева Ф.Ф., Ромащенко А.Г. // Биохимия. 1993. Т. 58. Вып. 2. С. 224 - 233.
23. Гудлицкий В.А. Химия органических соединений фтора. М.: Госхимиздат, 1961. С. 133.
24. Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18 - 23.
25. Венямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.И. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 941 - 950.
26. Зарытова А.Ф., Райт В.К., Черникова Т.С. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1626 - 1632.
27. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65 - 77.
28. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids / Ed. T.E. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. P. 589.
29. Shallenberg E.E., Calvin M. // J. Amer. Chem. Soc. 1955. V. 77. P. 2779 - 2783.

Affinity Modification of Amino Acid Derivatives of Oligonucleotides in Complementary Complex

T. S. Godovikova[#], M. V. Berezovskii*, and D. G. Knorre

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

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – Intracomplex photochemical interaction of photoactive derivatives R-CONH(CH₂)₃NH-pGATACCAA, where R = *p*-azidotetrafluorophenyl (I) or 2-nitro-5-azidophenyl (II), and 5'-phospho-*p*-azidoanilide pGATACCAA (III) with a target – oligonucleotide *pGGTATCp (IV) and its derivatives *pGGTATCp-NH(CH₂)₃NHX, where X = H (V), Phe (VI), or Lys (VII), was studied. According to electrophoretic data, photoreagent (I) gives rise to a covalent photoadduct with compound (IV) as well as with derivatives (VI) and (VII). In the case of reagent (II), only targets (V) - (VII) including aliphatic amino groups participate in the photocoupling. Upon irradiation of the duplexes comprising photoreagent (III) and targets (V) - (VII), the process is accompanied by the cleavage of the reagent's oligonucleotide moiety off the photo-modification product. A plausible mechanism of the cleavage is discussed.

Key words: oligonucleotide derivatives, photoaffinity modification, aromatic azides, amino acid derivatives.

[#] To whom correspondence should be addressed.