



УДК 577.113.4

СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ, СОДЕРЖАЩИХ 1-(4-(3-(ТРИФТОРМЕТИЛ)-3Н-ДИАЗИРИН-3-ИЛ)БЕНЗАМИДО)-2,3-ПРОПАНДИОЛ, ДЛЯ ФОТОАФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 2002 г. Ю. Ю. Агапкина^{*,#}, Д. В. Агапкин^{**}, А. В. Загородников^{**},
Я. И. Алексеев^{***}, Г. А. Коршунова^{**}, М. Б. Готтих^{**}

** Институт проблем химической физики РАН,
142432, Черноголовка, Институтский пр., 14;*

*** Химический факультет и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;*

**** ЗАО "Синтол", Москва*

Поступила в редакцию 27.07.2001 г. Принята к печати 22.11.2001 г.

Получено амидофосфитное производное 1-(4-(3-(трифторметил)-3Н-диазирин-3-ил)бензамидо)-3-О-(4,4'-диметокситритил)-2,3-пропандиола, которое использовано в качестве модифицированного звена в автоматическом синтезе олигодезоксирибонуклеотидов. На примере пентадекатимидилата показано, что наличие в цепи одного остатка пропандиола, содержащего арил(трифторметил)дiazирин (ATFMD), снижает термостабильность образуемого им с олигодезоксирибоаденилатом дуплекса на 8–9°C. При облучении УФ-светом с длиной волны 350 нм дуплексов, в которых одна из цепей содержит модифицированный ATFMD пропандиол, наблюдается реакция этой фотоактивной группировки с второй цепью дуплекса, приводящая к образованию "сшитых" дуплексов. Эффективность фотомодификации ДНК не зависит от нуклеотидной последовательности цепей дуплекса и составляет приблизительно 5% на одну ATFMD-группу. Облучение ATFMD-содержащего дуплекса, являющегося субстратом интегразы вируса иммунодефицита человека, в присутствии этого фермента приводит к образованию ковалентного ДНК-белкового комплекса. Олигонуклеотиды, содержащие 1-(4-(3-(трифторметил)-3Н-дiazирин-3-ил)бензамидо)-2,3-пропандиол в цепи, могут применяться для фотоаффинной модификации как нуклеиновых кислот, так и узнающих их белков.

Ключевые слова: олигонуклеотиды; фотоаффинная модификация; арил(трифторметил)дiazирин; интеграза.

ВВЕДЕНИЕ

Фотоаффинная модификация – один из наиболее активно используемых подходов к изучению структуры и функций нуклеиновых кислот, белков и их комплексов. Под действием облучения введенные в состав НК или белка фотоактивные группы превращаются в высокорекреационноспособные частицы (радикал, карбен, нитрен), которые атакуют соседние группы атомов с образованием ковалентной связи [1]. Идентификация продукта фотореакции позволяет судить о структурной и динамической организации системы.

В качестве фотоактивируемых производных обычно используют тио- и галогенсодержащие аналоги гетероциклических оснований [1], а так-

же арилазидные производные НК [2]. Следует отметить, что все перечисленные фотоактивные группы при облучении способны взаимодействовать только с нуклеофильными и ароматическими соединениями [1, 2]. В последнее время большое внимание уделяется арил(трифторметил)дiazириновым (ATFMD) производным НК [3]. Поглощая при длинах волн 355–365 нм, не повреждающих биологические молекулы, diaзирин генерирует карбен (схема 1), который способен взаимодействовать с любой близлежащей группировкой, включая группы, содержащие алифатические C–H-связи [4]. Такая высокая реакционная способность ATFMD-группы является ее важным преимуществом по сравнению с другими фотоактивными группировками и значительно расширяет возможности метода фотоаффинной модификации.

Время жизни карбена находится в наносекундном диапазоне [4], что позволяет помимо структурных проводить также и кинетические исследования. Таким образом, diaзирины рассматривают-

Сокращения: ATFMD – арил(трифторметил)дiazирин; HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфонокислота; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека.

[#]Автор для переписки (эл. почта: Jagarkina@rambler.ru; тел.: (095) 939-54-07; факс: (095) 939-31-81).

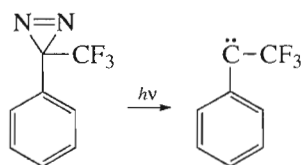


Схема 1. Схема генерации карбена из ATFMD.

природы [6]. Именно этот подход мы решили использовать для получения производных олигонуклеотидов, содержащих ATFMD-группу.

Цель данной работы – синтез олигонуклеотидных производных, содержащих ATFMD-группу в составе ненуклеозидного линкера, и исследование возможности их применения для фотоаффинной модификации как белков, так и нуклеиновых кислот.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже отмечалось выше, для получения фотоактивных производных олигонуклеотидов нами был выбран подход, при котором ATFMD-группа (где арил представлен бензоильной группой) вводится в олигонуклеотид в составе вставки ненуклеозидной природы. В качестве ненуклеозидной вставки мы применяли коммерчески доступный реагент – 1-амино-2,3-пропандиол. Необходимо отметить, что введение ATFMD-группы в олигонуклеотиды теоретически возможно как постсинтетически, а именно, посредством обработки сукцинимидным эфиром 4-(3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил)бензойной кислоты деблокированной аминогруппы уже введенного в олигонуклеотидную цепь аминокриотола, так и непосредственно в процессе автоматического олигонуклеотидно-

ся как многообещающие реагенты для изучения биополимеров. В литературе приводятся многочисленные примеры использования ATFMD-производных НК для фотоаффинной модификации белков [3], однако данные о фотоаффинной модификации самих нуклеиновых кислот этими производными до настоящего времени отсутствовали.

ATFMD-группу можно вводить в олигонуклеотиды по гетероциклическому основанию, углеводному фрагменту, по межнуклеотидным и концевым фосфатным группам [3]. Из литературных данных известно, что синтез нуклеозидов, содержащих ATFMD-группу, – трудоемкий и многостадийный процесс, а выход целевых продуктов, как следствие, низок [5]. Вместе с тем существует способ введения в олигонуклеотиды различных группировок в составе линкера ненуклеозидной

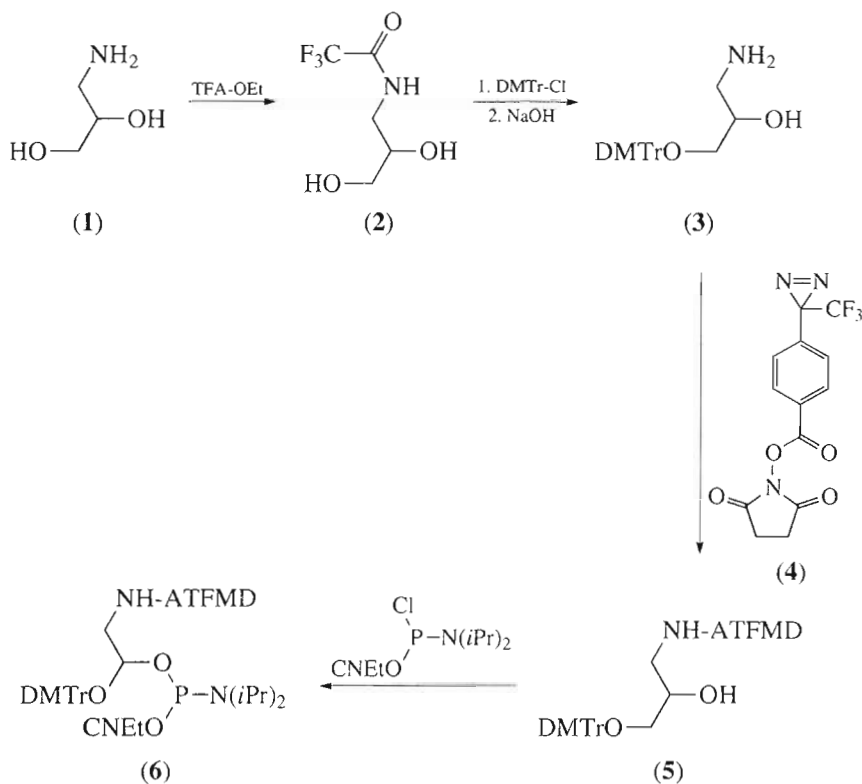


Схема 2. Схема синтеза 2-(*N,N*-диизопропиламино)-β-цианэтилфосфита 1-(4-(3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил)бензамидо)-3-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2,3-пропандиола (6).

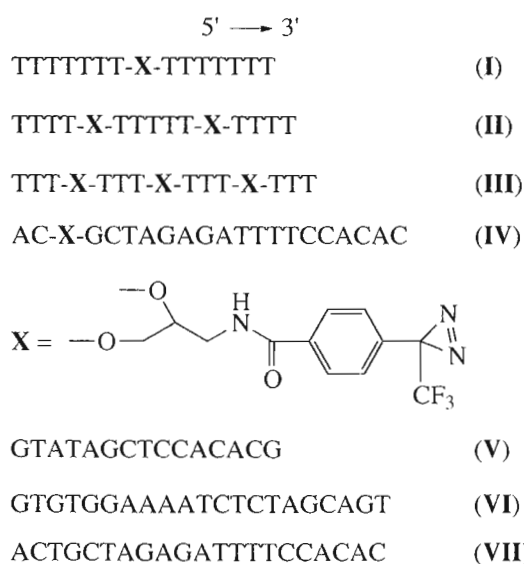


Схема 3. Структура синтезированных олигодезоксинуклеотидов (символ d опущен).

го синтеза с использованием синтона, содержащего ATFMD-группу. Нами был выбран второй метод, так как он позволяет получать олигонуклеотиды, содержащие фотоактивную группу, с более высокими выходами. В связи с этим первым этапом работы был синтез амидофосфита, содержащего ATFMD-группу.

2-(*N,N*-Диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфит 1-(4-(3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил)бензамидо)-3-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2,3-пропандиола (6) синтезировали в соответствии со схемой 2. Предварительные опыты показали, что ацилирование аминогруппы 1-амино-2,3-пропандиола (1) сукцинимидным эфиром 4-(3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил)бензойной кислоты (4) проходит с низким выходом. По всей видимости, это обусловлено плохой растворимостью амина (1) в органических растворителях. По этой причине мы вводили ATFMD-группу в диметокситритилированное производное 1-амино-2,3-пропандиола (3).

Первой стадией синтеза являлась защита аминофункции 1-амино-2,3-пропандиола (1) трифторацетильной группой. Реакцию проводили в диметилформамиде в присутствии триэтиламина; в качестве ацилирующего агента был выбран этиловый эфир трифторуксусной кислоты, так как он селективно реагирует с аминогруппой.

Первичную гидроксильную группу 1-(2,2,2-трифторацетамидо)-2,3-пропандиола (2) блокировали диметокситритилхлоридом в абсолютном пиридине (3 ч). Известно, что время диметокситритилирования для подобных аминоклиолов колеблется от 4 до 18 ч [7, 6]. Предварительные эксперименты показали, что в нашем случае за 3 ч не образуется побочного продукта диметокситритилирова-

ния по вторичной гидроксильной группе, поэтому это время было выбрано для проведения реакции. Трифторацетильную защиту удаляли в щелочной среде и очистку целевого продукта (3) осуществляли колоночной хроматографией на силикагеле.

Сукцинимидный эфир 4-(3-(трифторметил)-3*H*-диазирин-3-ил)бензойной кислоты (4) был синтезирован по многостадийной схеме, описанной Нассалем, из *n*-бромтолуола [8]. Конденсацию предварительно полученных сукцинимидного эфира (4) и амина (3) проводили в тетрагидрофуране в присутствии триэтиламина. Целевое соединение (5) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Полученное вещество было охарактеризовано масс- и ЯМР-спектрами.

Синтез амидофосфитного производного (6) соединения (5) проводили в абсолютном хлористом метиле в присутствии триэтиламина. В качестве фосфитирующего агента использовали 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламидохлорфосфит. Соединение (6) охарактеризовано ³¹P-ЯМР-спектром. Суммарный выход амидофосфита (6) в расчете на соединение (1) составил 38%.

Синтезированный амидофосфит (6) встраивался в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического синтеза. Использовалась стандартная схема синтеза, однако время конденсации на стадии включения модифицированного нуклеотидного звена было увеличено до 10 мин.

Была синтезирована серия олигонуклеотидов, содержащих ATFMD-группу в составе нуклеозидной вставки (схема 3).

Фотоаффинная модификация нуклеиновых кислот

Фотоаффинная модификация НК производными олигонуклеотидов, содержащими фотоактивные группы, может использоваться для ряда исследований в области молекулярной биологии, например для выяснения доступности того или иного района сложно организованной мРНК, для выявления НК-НК-контактов в белково-нуклеиновых комплексах (например, в рибосоме), в качестве инструмента для регуляции генной экспрессии.

В настоящей работе была исследована возможность использования для модификации НК олигонуклеотидов с ATFMD-содержащими нуклеозидными вставками. Были синтезированы олигонуклеотиды (I)–(III), представляющие собой последовательность (dT)₁₅, с 1, 2 и 3 вставками соответственно.

Вначале мы определили температуру плавления дуплексов, образованных модифицированными олигонуклеотидами и комплементарной матрицей (dA)₁₅. Как видно из данных таблицы, введение каждой нуклеозидной вставки с ATFMD-группой

понижает значение $T_{пл}$ дуплекса на 8–9°C по сравнению с немодифицированным ДНК-дуплексом.

Убедившись в устойчивости получаемых дуплексов, мы осуществили фотореакцию в них путем облучения смеси олигонуклеотид–матрица светом с длиной волны 351 нм при 4°C. Реакционные смеси анализировали в 20% денатурирующем ПААГ (рис. 1а). Ковалентная связь между цепями в дуплексах образовывалась с различной эффективностью в зависимости от числа ATFMD-содержащих вставок. Выходы продуктов фотореакции составили 4, 10 и 15% в случае олигонуклеотидов (I), (II) и (III) соответственно.

Для подтверждения того, что фотореакция происходила в составе комплементарного комплекса, мы провели облучение смеси, в которой комплементарная цепь (dA)₁₅ была заменена на 15-звенный олигонуклеотид произвольной последовательности (V). Как видно из рис. 1б, в этом случае образования продукта фотореакции не наблюдалось.

Далее мы изучали фотомодификацию нуклеиновых кислот в дуплексе, состоящем из олигонуклеотида (IV) и комплементарного ему 21-звенного олигонуклеотида (VI), в тех же условиях. Ковалентный конъюгат образовывался с эффективностью 5% (рис. 1в).

Полученные результаты позволяют рекомендовать олигонуклеотиды, содержащие ATFMD-группу в составе нуклеозидной вставки, в качестве реагентов для фотоаффинной модификации нуклеиновых кислот. Известно, что для этих целей могут быть использованы олигонуклеотиды, содержащие, например, тио-, арилазидную группы или псорален [9–11]. Каждый из таких реагентов имеет свои достоинства и недостатки. Поэтому выбор фотореагента зависит от стоящей перед исследователем задачи. Например, арилазидная группа позволяет достичь достаточно высоких выходов фотореакции (до 65%) [11], но может быть введена в олигонуклеотид только постсинтетически, что делает синтез более трудоемким. Тиогруппа и псорален встраиваются в олигонуклеотид в процессе автоматического синтеза и дают высокие выходы фотопрививки, но при облучении взаимодействуют только с пиримидиновыми гетероциклическими основаниями [9, 10], что ограничивает возможности их использования. Эффективность фотоаффинной модификации НК с помощью предлагаемых нами реагентов ниже, чем у вышеперечисленных, но благодаря высокой реакционной способности ATFMD-группы они могут реагировать с любой нуклеотидной последовательностью и поэтому более перспективны, например в исследованиях по зондированию пространственной структуры РНК.

Влияние числа нуклеозидных вставок с ATFMD-группой в олигодезоксинуклеотидах (I)–(III) на термическую устойчивость их дуплексов с dA₁₅-матрицей

Олигонуклеотид в составе дуплекса	Количество вставок	$T_{пл}$, °C ± 0.5°C
dT ₁₅	0	40
(I)	1	32
(II)	2	24
(III)	3	15

Фотоаффинная модификация белков

Фотоаффинная модификация белков является удобным инструментом для изучения НК-белковых взаимодействий. Испытания олигонуклеотида (IV) с ATFMD-группой в составе нуклеозидной вставки в качестве реагента для фотоаффинной модификации белков проводили на примере интегразы ВИЧ-1.

Для олигонуклеотида (IV) была выбрана последовательность, аналогичная 5'-концевому участку одной из цепей U5-района длинного концевого повтора кДНК ВИЧ-1. Этот участок кДНК узнается вирусным ферментом интегразой [12]. Интеграза относится к классу транспозаз и осуществляет встраивание вирусной ДНК в ДНК клетки-хозяина, катализируя две последовательные реакции: 3'-процессинг, представляющий собой отщепление динуклеотида GT с 3'-концов каждой цепи вирусной ДНК, и нуклеофильную атаку 3'-гидроксилом процессированной вирусной ДНК межнуклеотидного фосфата человеческой

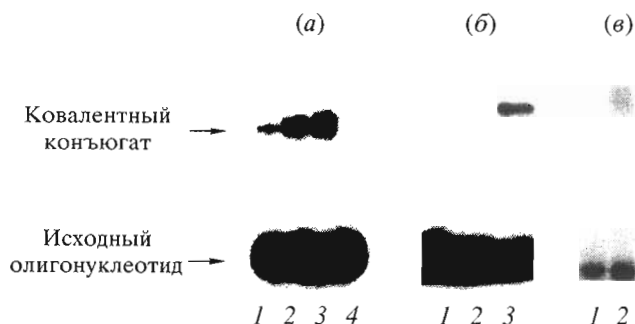


Рис. 1. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% денатурирующем ПААГ продуктов фотореакции между цепями в ДНК-дуплексах. (а) Дуплексы, образованные 5'-³²P-меченым (dA)₁₅ и олигонуклеотидами (I), (II) и (III) после облучения (соответственно 1, 2 и 3); 5'-³²P-меченый олигонуклеотид (dA)₁₅, облученный в отсутствие модифицированной цепи (4). (б) Дуплекс, образованный олигонуклеотидом (I) и 5'-³²P-мечеными олигонуклеотидами: (dA)₁₅ без облучения (1); (V) после облучения (2); (dA)₁₅ после облучения (3). (в) Дуплекс (VI + IV) без облучения (1), после облучения (2); ³²P-метка вводилась на 5'-конец олигонуклеотида (IV).

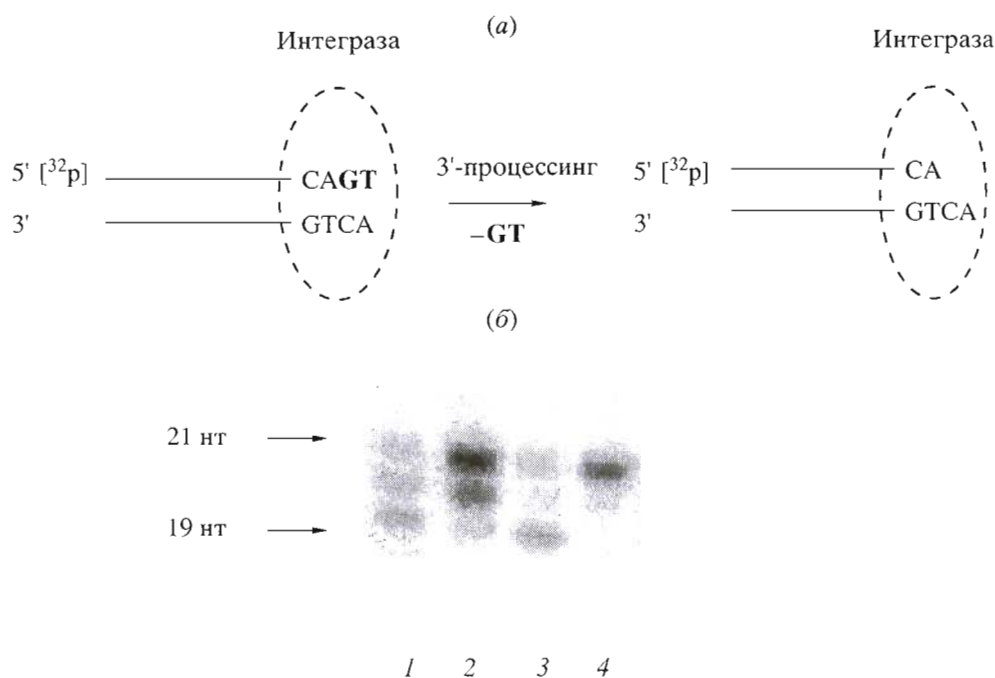


Рис. 2. Влияние ATFMD-группы на эффективность 3'-концевого процессинга. (а) Схема 3'-концевого процессинга. (б) Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20% ПААГ (7 М мочевины) продуктов 3'-концевого процессинга дуплексов (VI + VII) (1) и (VI + IV) (3); исходные дуплексы (VI + IV) (2) и (VI + VII) (4). Стрелками указано положение исходного ^{32}P -меченого 21-звенного олигонуклеотида (VI) и 19-звенного продукта его процессинга.

ДНК. Известно, что интеграса узнает участки вирусной ДНК, локализованные в U5- и U3-фрагментах длинных концевых повторов, и связывается с ними [12]. Однако полная информация об участии конкретных аминокислот и нуклеотидов в ДНК-белковом взаимодействии до сих пор не получена.

Ранее методом фотоаффинной модификации с использованием модифицированных аналогов субстрата, содержащих 5-йодуридиновые [13, 14] или арилизидные фотометки [15], было показано, что в фермент-субстратном комплексе существует контакт между Lys159 интеграсы и аденозином, расположенным в третьем положении от 3'-конца процессируемой цепи вирусной ДНК. Однако данные о возможных контактах интеграсы с непроцессируемой цепью субстрата в литературе отсутствуют. Поскольку олигонуклеотид (IV) имеет последовательность, аналогичную последовательности непроцессируемой цепи, мы ввели ATFMD-содержащую группировку в третье от 5'-конца положение этого олигонуклеотида для того, чтобы протестировать возможные контакты интеграсы с непроцессируемой цепью вирусной ДНК.

Изучение взаимодействия интеграсы ВИЧ-1 с вирусной ДНК представляет собой довольно трудную задачу, поэтому *in vitro* этот процесс обычно моделируют при помощи более простых систем [16, 17]. В качестве субстрата использовался 21-звенный ДНК-дуплекс, содержащий участок узнавания интеграсы из U5-фрагмента длинного кон-

цевого повтора вирусной ДНК-дуплекс (VI + VII), а в качестве ATFMD-содержащего аналога субстрата – дуплекс (VI + IV).

Прежде чем проводить фотомодификацию белка, мы убедились в том, что дуплекс (VI + IV) подвергается специфическому 3'-процессингу. Как уже упоминалось ранее, в результате процессинга происходит отщепление динуклеотида GT с 3'-конца процессируемой цепи с образованием 19-звенного олигонуклеотида из исходного 21-звенного (рис. 2а). Анализ эффективности процессинга проводили методом электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 2б). Появление полосы, соответствующей укороченному на два звена олигонуклеотиду, свидетельствовало об успешном протекании реакции. Эффективность процессинга немодифицированного субстрата (VI + VII) составила 40%, а субстрата (VI + IV), содержащего ATFMD-группу, – 38%. Другими словами, модификация не влияла на специфичность взаимодействия и каталитическую активность фермента. Это позволило нам использовать модифицированный дуплекс (VI + IV) для изучения взаимодействия интеграсы с субстратом.

Мы провели фотоактивируемое присоединение аналога субстрата, содержащего ATFMD-группу, к интеграсе. Для этого модифицированный дуплекс (VI + IV) инкубировали с интеграсой в течение 30 мин при 37°C и затем облучали при 351 нм в течение 10 мин во льду. Образование ко-

валентного конъюгата фиксировали с помощью белкового электрофореза в присутствии SDS. Радиоактивная метка вводилась на 5'-конец олигонуклеотида (IV). Результат фотоприсоединения представлен на рис. 3.

Необходимо отметить, что используемая нами рекомбинантная интеграза имеет молекулярную массу 32 кДа. Следовательно, радиоактивная полоса на геле, расположенная в области масс между 31 и 45 кДа, соответствует продукту присоединения радиоактивно меченного 21-звенного олигонуклеотида к молекуле интегразы. Выход продукта фотореакции составил 3.5%. Таким образом, ATFMD-группа в составе ненуклеозидной вставки, введенная в дуплекс, являющийся субстратом интегразы ВИЧ-1, позволила выявить контакт интегразы с непротессуруемой цепью вирусной ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламидохлорфосфит, дитиотреит, Трис-НСl, HEPES, LiClO₄, MnCl₂, акриламид (Aldrich, США); [γ -³²P]АТФ для введения радиоактивной метки во фрагменты ДНК (Изотоп, Россия); полинуклеотидкиназу бактериофага Т4 (ед. акт./моль) (Promega, США). Рекомбинантная интеграза ВИЧ-1 любезно предоставлена д-ром Жан-Франсуа Мускаде (институт Гюстава Русси, Вилльжуиф, Франция). Для контроля за ходом реакции в процессе синтеза соединения (5) использовали ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Вещества, содержащие ароматические группы, обнаруживали на хроматограммах по УФ-поглощению. Соединения со свободной аминогруппой идентифицировали нингидриновым реактивом (раствор 0.4 г нингидрина в смеси пиридин–изопропанол, 1 : 4). Алифатические соединения идентифицировали прокрашиванием парами йода. ТСХ проводили в следующих системах растворителей: хлороформ–метанол, 90 : 10 (А); хлороформ–метанол, 96 : 4 (Б); хлороформ (В).

Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле G60 (Merck, Германия) на колонке 20 × 250 мм со скоростью элюции 2.5 мл/мин.

Сукцинимидный эфир 4-(3-(трифторметил)-3*H*-диазирип-3-ил)бензойной кислоты (4) синтезировали по схеме, описанной Нассалем [8]. В качестве исходного реагента использовали *n*-бромтолуол. Суммарный выход соединения (4) в расчете на исходное соединение составил 11%, *R_f* 0.9 (В).

2-(*N,N*-Диизопропиламидо)- β -цианэтилфосфит 1-(4-(3-(трифторметил)-3*H*-диазирип-3-ил)бензамидо)-3-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2,3-пропандиола (6) (схема 2).

1-(2,2,2-Трифторацетиамидо)-2,3-пропандиол (2). К раствору 1 г (11 ммоль) 1-амино-2,3-пропандиола (1) в 10 мл DMF при перемешивании по каплям добавили 4 мл этилового эфира трифторуксусной

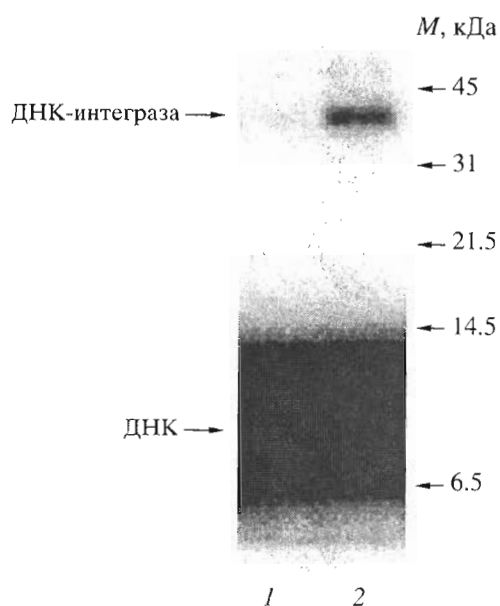


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 15% ПААГ в присутствии SDS продуктов фотореакции дуплекса (VI + IV) с интегразой (2); комплекс интегразы – (VI + IV) без облучения (1); *M* – белковые маркеры молекулярных масс.

кислоты и 2 мл триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре, затем упарили. Остаток растворили в 50 мл смеси хлороформ–метанол (9 : 1) и промыли 50 мл воды. Органический слой упарили. Продукт (*R_f* 0.5 (А)) использовали на следующей стадии без очистки.

1-Амино-3-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2,3-пропандиол (3). Полученное на предыдущей стадии в виде масла соединение (2) переупарили с абс. пиридином (3 × 20 мл), затем при перемешивании по каплям добавили раствор 3.3 г (9.7 ммоль) диметокситритилхлорида в 5 мл пиридина. Раствор перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упарили, к полученному маслянистому остатку добавили 10 мл 1 М NaOH в водном этаноле (1 : 1). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч, затем упарили до масла, растворили в 50 мл хлороформа и промыли водой (2 × 50 мл). Органическую фазу сушили безводным сульфатом натрия. Соединение (3) очищали хроматографией на колонке с силикагелем в ступенчатом градиенте метанола (0–7%) в хлороформе. Выход 2.9 г (66% в расчете на соединение (1)). *R_f* 0.1 (А). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 2.76 (т, 2H, NH₂); 2.79 (м, 2H, CH₂NH₂); 3.14 (д, 2H, CH₂); 3.27 (с, 6H, 2OCH₃); 3.77 (м, 1H, CHOH); 6.81–7.46 (м, 13H, C₆H₅(CH₃OC₆H₄)₂). Масса: *m/z* 394 (*M* + 1).

1-(4-(3-(Трифторметил)-3*H*-диазирип-3-ил)бензамидо)-3-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2,3-пропандиол (5). Раствор 500 мг (1.2 ммоль) амина (3) и 431 мг (1.32 ммоль) сукцинимидного эфира (4) в смеси

4 мл абс. ТНФ и 0.5 мл триэтиламина перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали до масла, растворили в 50 мл хлороформа и промыли водой (2 × 50 мл). Органическую фазу сушили безводным сульфатом натрия. Очистку соединения (5) производили хроматографией на колонке с силикагелем в ступенчатом градиенте метанола (0–5%) в хлороформе. Выход 600 мг (80%). R_f 0.5 (А). $^1\text{H-ЯМР}$ (CDCl_3): 3.25 (д, 2H, CH_2); 3.5 (т, 2H, CH_2NH); 3.78 (с, 6H, OCH_3); 4.02 (м, 1H, CHOH); 6.9–7.6 (м, 17H, $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_4)_2$, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CN}_2\text{CF}_3$), m/z 578 ($M + 1 - \text{N}_2$).

2-(*N,N*-Диизопропиламида)- β -цианэтилфосфит 1-(4-(3-(трифторметил)-3*H*-дiazирин-3-ил)бензамидо)-3-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2,3-пропандиола (6). К раствору 100 мг (0.16 ммоль) соединения (5) в 2 мл абс. хлористого метилена по каплям добавили 50 мкл (0.18 мкмоль) 2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламидохлорфосфита, перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали до масла и растворили в 50 мл хлороформа, затем промыли 50 мл насыщенного раствора соды. Органическую фазу сушили безводным сульфатом натрия. Продукт осаждали гексаном. Выход 95 мг (73%). R_f 0.7 (Б). $^{31}\text{P-ЯМР}$ (CDCl_3): 148.75; 148.02.

Синтез олигонуклеотидов (I)–(VII) выполняли на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM 102U (Новосибирск, Россия) с применением стандартной амидофосфитной схемы синтеза. На стадии введения соединения (6), содержащего ATFMD-группу, время конденсации увеличено до 10 мин. Выделение олигонуклеотидов осуществляли в денатурирующем 20% ПААГ.

$5'$ - ^{32}P -Фосфорилирование олигонуклеотидов проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы в течение 40 мин при 37°C в 10 мкл буфера (50 mM Трис-НСl, pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM дитиотреит), содержащего [γ - ^{32}P]АТР. При $5'$ - ^{32}P -фосфорилировании олигонуклеотидов (I)–(III) использовали 10 ед. акт. фермента на 50 пмоль олигонуклеотида, в случае олигонуклеотида (VI) – 10 ед. акт. фермента на 10 пмоль олигонуклеотида. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 0.25 mM EDTA, после этого к смеси добавляли эквивалентное количество комплементарного нуклеотида (IV) или (VII) и 0.8 мкл раствора 5 M NaCl. Объем смеси доводили до 40 мкл водой, смесь нагревали до 90°C и медленно охлаждали. Радиоактивно меченные ДНК-дуплексы выделяли центрифугированием на хроматографических колонках Micro Bio-Spin®. Радиоактивность ^{32}P -меченых препаратов измеряли по Черенкову на счетчике Delta-300 (Tracor, Нидерланды).

Температурную зависимость УФ-поглощения дуплексов изучали при 260 нм на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном термоста-

тируемым кюветодержателем, при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5°C/мин от 10 до 80°C. Использовали термостатируемые кварцевые кюветы Pye Unicam (Великобритания) с длиной оптического пути 1 см. Концентрация каждой цепи 5 мкМ. Использовали буфер, содержащий 50 mM Трис-НСl, 20 mM MgCl_2 , pH 7.0.

Реакция 3'-концевого процессинга. К раствору 0.2 пмоль дуплекса (VI + VII) или (VI + IV), содержащего радиоактивно меченный олигонуклеотид (VI), в 10 мкл буфера А (20 mM HEPES, 1 mM дитиотреит, 20 mM MnCl_2) добавляли раствор 10 пмоль интегразы в 10 мкл того же буфера и термостатировали 1 ч при 37°C. По завершении реакции к смеси добавляли 80 мкл 8 M мочевины, выдерживали 5 мин при 90°C, интегразу экстрагировали 100 мкл смеси хлороформ–изоамиловый спирт (24 : 1). Нуклеотидный материал осаждали из воды ацетоном, содержащим 2% LiClO_4 , и анализировали электрофоретически в 20% ПААГ, содержащем 7 M мочевину, с последующей радиоавтографией геля.

ATFMD-содержащие олигонуклеотиды облучали с использованием алюмо-иттриевого лазера (Nd : YAG) со средней мощностью 30 мВт/см², при длине волны 351 нм.

Ковалентное связывание цепей в ДНК-дуплексах, содержащих ATFMD-группу. Реакционную смесь (20 мкл) с концентрацией дуплекса 10^{-3} M в буфере, содержащем 0.02 M Трис-НСl, 0.02 M MgCl_2 , pH 7.3, наносили на Parafilm M (Sigma, США) и облучали в течение 5 мин при 4°C. В олигонуклеотид, включающий ATFMD-группу, предварительно вводили 5'-концевую ^{32}P -метку. Анализировали в 20% денатурирующем ПААГ.

Ковалентное присоединение интегразы к дуплексу (IV + VI), содержащему ATFMD-группу. Реакционную смесь, содержащую 0.4 пмоль дуплекса с радиоактивно меченым олигонуклеотидом (IV) и 10 пмоль интегразы в 20 мкл буфера (А), инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После инкубации 20 мкл смеси наносили на Parafilm M (Sigma, США) и облучали в течение 5 мин при 4°C. Анализ образования НК-белкового конъюгата проводили с помощью электрофореза в 15% ПААГ в присутствии SDS при напряжении 300 В.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.И. Бекетову (МГУ, хим. фак-т) за помощь в проведении фотохимических экспериментов и Ж.-Ф. Мускаде (институт Гюстава Русси, Франция) за предоставленную интегразу ВИЧ-1. Авторы также благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за финансовую поддержку (гранты РФФИ № 02-04-48797, 00-04-48312 и РФФИ-НЦНИ № 00-04-22003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meisenheimer K.M., Koch T.H. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 32. P. 101–140.
2. Knorre D.G., Godovikova T.S. // *FEBS Lett.* 1998. V. 433. P. 9–14.
3. Коршунова Г.А., Сумбатян Н.В., Топин А.Н., Мчедлидзе М.Т. // *Молекулярн. биология.* 2000. Т. 34. С. 966–983.
4. Bayley H. // *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology* / Eds Work T., Burdon R. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1983. V. 12. P. 187–190.
5. Yamaguchi T., Saneyoshi M. // *Nucleosides Nucleotides.* 1996. V. 15. P. 607–613.
6. Nelson P.S., Kent M., Muthini S. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 6253–6259.
7. Nelson P.S., Sherman-Gold R., Leon R. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 7179–7186.
8. Nassal M. // *Liebigs Ann. Chem.* 1983. V. 9. P. 1510–1523.
9. Favre A., Saintome C., Fourrey J.-L., Clivio P., Laugaa P. // *J. Photochem. Photobiol.* 1998. V. 42. P. 109–124.
10. Reynolds M.A., Beck T.A., Hogrefe R.I., McCaffrey A., Arnold L.J., Vaghefi M.M. // *Bioconjug. Chem.* 1992. V. 3. P. 366–374.
11. Левина А.С., Васильева Т.В., Зарытова В.Ф. // *Биооргани. химия.* 1999. Т. 25. С. 56–61.
12. Brown P.O. // *Current Top. Microbiol. Immunol.* 1990. V. 157. P. 19–48.
13. Jenkins T.M., Esposito D., Engelman A., Craigie R. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 6849–6859.
14. Esposito D., Craigie R. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 5832–5843.
15. Heuer T.B., Brown P.O. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 10655–10664.
16. Craigie R., Mizuuchi K., Bushman F.D., Engelman A. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 2729–2734.
17. Fesen M.R., Kohn K.W., Leteurtre F., Pommier Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 2399–2403.

The Synthesis of Oligonucleotide Derivatives with Aryl(trifluoromethyl)diazirine Moiety for the Photoaffinity Modification of Proteins and Nucleic Acids

Yu. Yu. Agapkina[#], D. V. Agapkin^{**}, A. V. Zagorodnikov^{**},
Ya. I. Alekseev^{***}, G. A. Korshunova^{**}, and M. B. Gottikh^{**}

[#]Phone: +7 (095) 939-5407; fax: +7 (095) 939-3181; e-mail: jagapkina@rambler.ru

^{*}Institute of Chemical Physics Problems, Russian Academy of Sciences,
Institutskii pr. 14, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

^{**}Chemical Faculty and Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

^{***}Syntol ZAO, Timiryazevskaya ul. 42, Moscow, 127550 Russia

1-(4-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzamido)-3-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2,3-propanediol phosphoramidite was synthesized and used as a modified unit in the automatic synthesis of oligodeoxyribonucleotides. Pentadecathymidylates with various numbers of 2,3-propanediol moieties substituted with aryl(trifluoromethyl)diaziriny (ATFMD) were obtained, and the thermal stability of their duplexes with (dA)₁₅ were studied. One ATFMD-propanediol residue was shown to reduce the thermal stability of the duplex by 8–9°C. The irradiation of the ATFMD-containing duplexes by UV light with the wavelength of 350 nm was found to cause the cross-linking reaction of the ATFMD-containing strand with the complementary strand and the formation of the cross-linked duplexes. The photomodification efficiency was independent of the oligonucleotide sequence, with each ATFMD group providing for 5% cross-linking. The irradiation of an ATFMD-containing duplex, a substrate of the HIV-1 integrase, in the presence of this enzyme resulted in the covalent DNA–protein complex. The oligonucleotides with the 1-(4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzamido)-2,3-propanediol moiety in their chains can be used for the photoaffinity modification of both nucleic acids and proteins that recognize them. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: aryl(trifluoromethyl)diazirine, integrase, oligonucleotides, photoaffinity modification