



УДК 547.963.32.07

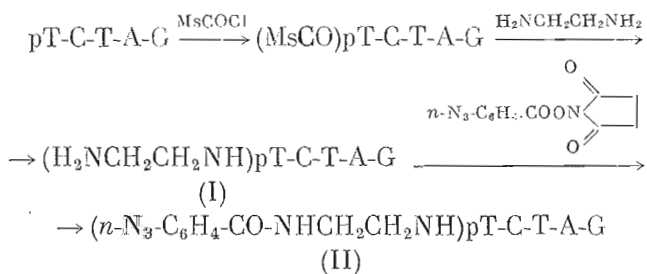
СИНТЕЗ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ АРИЛАЗИДСОДЕРЖАЩИХ
ПРОИЗВОДНЫХ ПЕНТАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА*Ивановская М. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Описаны два метода введения фотоактивируемой арилизидной группировки в олигодезоксирибонуклеотиды. Синтезированы *n*-азидобензоильные производные пентануклеотида рТ-С-Т-А-Г по концевому фосфату олигонуклеотида и по экзоциклической аминогруппе цитозина. Светочувствительность арилизидной группы сохраняется при синтезе описываемых соединений, что было показано на примере фоторазложения производных мононуклеотидов.

Для аффинного мечения биополимеров наиболее широко используются фотоактивируемые аналоги субстратов [1]. Реагенты, в состав которых входит ароматическая азидная группа, при облучении светом способны ковалентно связываться с любыми сближенными в пространстве группами биополимеров практически независимо от их химической природы [2].

Для введения ароматической азидной группировки в состав олигодезоксирибонуклеотидов мы разработали два варианта избирательной модификации наиболее реакционноспособных групп олигодезоксирибонуклеотидов — концевого фосфата и экзоциклической аминогруппы цитозина. В настоящем сообщении на примере пентануклеотида рТ-С-Т-А-Г, в состав которого входят все четыре основания ДНК, описывается синтез производных такого типа. Закрепление арилизидной группы в различных позициях одного и того же олигонуклеотида позволит конструировать реагент, способный различать близкорасположенные фрагменты биополимера.

Соединение первого типа, в котором модификации подвергается фосфомоноэфирная группа олигонуклеотида, получали в соответствии с разработанным ранее общим методом ацилирования фосфамидов нуклеотидов (I) [3] оксисукцинимидным эфиром по схеме:



Сокращения: MsCOCl — хлорангидрид мезитилекарбоновой кислоты MsCOOH; abzC — N⁴-*n*-азидобензоилдезокситидин; *n*-N₃-C₆H₄-CO — *n*-азидобензоил. Нуклеотиды, обсуждаемые в этой статье, принадлежат к дезоксирияду, поэтому префикс d для краткости всюду опущен.

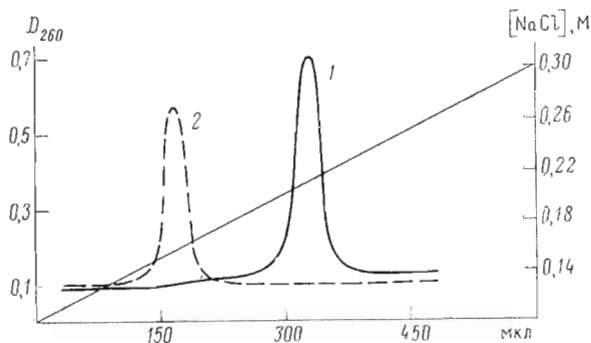


Рис. 1. Микроколоночная хроматография (MsCO)рТ-С-Т-А-Г (1) и $(\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})\text{pT}-\text{C}-\text{T}-\text{A}-\text{G}$ (2) на DEAE-целлюлозе (Cl^- , 1×60 мм) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, 0,01 М трис-HCl, рН 7,5. Скорость элюции 660 мкл/ч

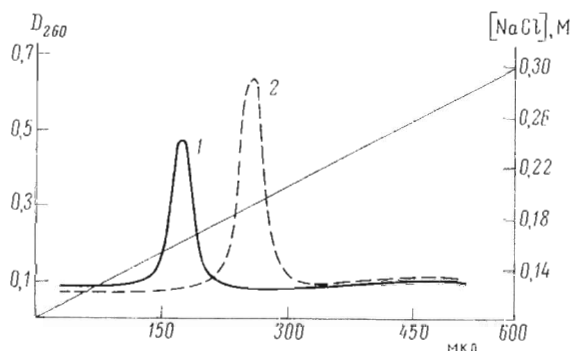


Рис. 2. Микроколоночная хроматографии $(\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}) \cdot \text{pT}-\text{C}-\text{T}-\text{A}-\text{G}$ (1) и $(n-\text{N}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})\text{pT}-\text{C}-\text{T}-\text{A}-\text{G}$ (2) на DEAE-целлюлозе (Cl^- , 1×60 мм) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины, 0,01 М трис-HCl, рН 7,5. Скорость элюции 660 мкл/ч

Фосфамид (I) получали в одну стадию методом смешанных ангидридов. При обработке водного раствора смешанного ангидрида пентануклеотида и мезитиленкарбоновой кислоты 100-кратным избытком этилендиамина при 37° через 3 сут наблюдали полное превращение смешанного ангидрида в соответствующий фосфамид (I). Контроль за ходом реакции проводили методом микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Генера при рН 7,5 [4] (рис. 1). Фосфамид пентануклеотида с этилендиамином (I) выделяли ионообменной колоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Полученный фосфамид пентадезоксирибозуклеотида не гидролизует фосфомоноэстеразой и содержит незамещенную алифатическую аминогруппу, о чем свидетельствует положительная реакция с нингидридом.

Арилазидную группу вводили ацилированием соединения (I) 10-кратным избытком оксисукцинимидного эфира *n*-азидобензойной кислоты при 4° . Соединение (II) выделяли методом БХ.

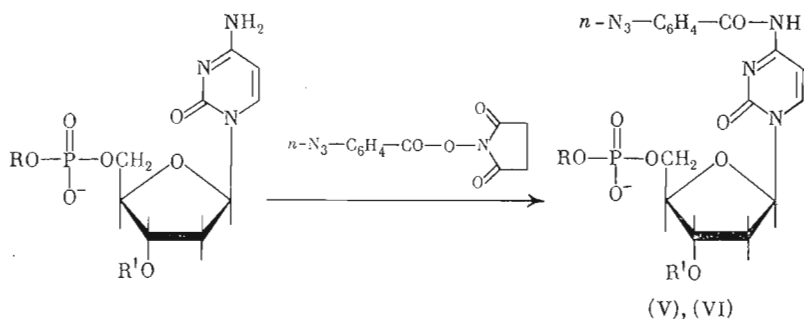
Гомогенность соединений (I) и (II) показана хроматографией и электрофорезом на бумаге (см. таблицу), а также микроколоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе (рис. 2).

Характеристики *n*-азидобензоилсодержащих производных моно- и пентадезоксирибонуклеотидов

Соединение	Выход, %	R_f в системах		E_{pT}	УФ-спектр		Молярное соотношение компонентов гидролизата
		А	Б		$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\lambda_{\text{мин}}$, нм	
(I)	65		0,21	0,76	262	234	(H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -NH)pT:pC:pT:pA: :pG=0,95:0,75:1,12:1,00
(II)	80		0,39		265	236	(<i>n</i> -N ₃ -C ₆ H ₄ -CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH)pT: :pC:pT:pA:pG=0,90:0,85:1,05:1,00
(III)	90	0,57		0,04	268	236	H ₂ N-(CH ₂) ₂ -NH ₂ :pT=1,08:1,00
(IV)	95	0,80		0,38	272	236	<i>n</i> -N ₃ -C ₆ H ₄ -CO-NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂ :pT= =1,00:0,85
(V)	60	0,42		1	260,307	238	pC: <i>n</i> -N ₃ -C ₆ H ₄ -CO-NH ₂ =1:0,90
(VI)	35			1	265,320	238	pT-C-T-A-G: <i>n</i> -N ₃ -C ₆ H ₄ -CO-NH ₂ = =1,00:0,95

Для доказательства структуры полученных соединений проводили их расщепление фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим количественным определением компонентов гидролизата (таблица). Олигонуклеотидные производные (I) и (II) гидролизовали фосфодиэстеразой змеиного яда и хроматографией на бумаге отделяли 5'-концевое звено олигонуклеотида, содержащее модифицирующую группу, от смеси остальных нуклеотидов, соотношение которых определяли микроколonoчной хроматографией на дауксе-1 по методике [5]. Для идентификации 5'-концевого фрагмента по схеме, описанной для пентануклеотида, были получены (H₂N-CH₂-CH₂-NH)pT(III) и (*n*-N₃-C₆H₄-CO-NH-CH₂-CH₂-NH)pT(IV) с выходом 90 и 95% соответственно. Структуру соединений (III) и (IV) доказывали с помощью кислотного гидролиза 1 н. HCl в течение 12 ч при 37°. Количество образующихся при гидролизе pT и *n*-N₃-C₆H₄-CO-NH-(CH₂)₂-NH₂ определяли спектрофотометрически, количество этилендиамина — как указано в работе [3] (см. таблицу).

При ацилировании алифатической аминогруппы в соединении (I) гетероциклические основания не модифицируются. В то же время известно, что в более жестких условиях (продолжительное нагревание при 80° в водно-органической среде) с помощью оксисукцинимидных эфиров



(V): R = R¹ = H

(VI): R = pT, R¹ = pT-A-G

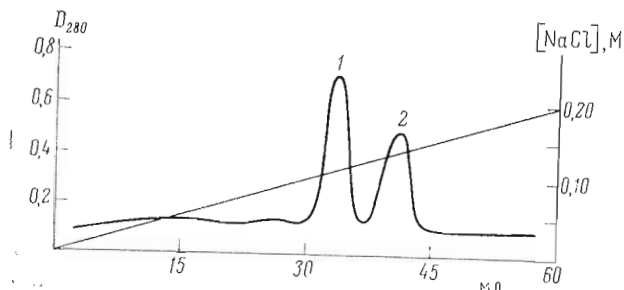


Рис. 3. Хроматографическое выделение рТ-abzC-T-A-G на DEAE-целлюлозе (Cl^- , $0,7 \times 11$ см) в линейном градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины при pH 3,5. Скорость элюции 10 мл/ч. 1 — рТ-C-T-A-G; 2 — рТ-abzC-T-A-G

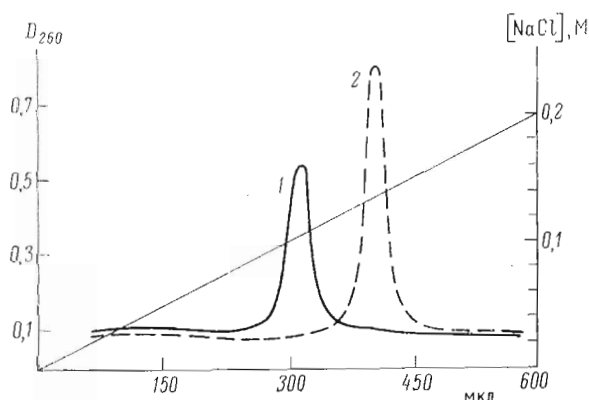


Рис. 4. Микроколоночная хроматография рТ-abzC-T-A-G (1) и рТ-C-T-A-G (2) (Cl^- , 1×60 мм) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины при pH 3,5. Скорость элюции 660 мкл/ч

ароматических кислот можно избирательно ацилировать аминогруппы цитозина [6]. Это позволило подобрать условия для введения остатка *n*-азидобензойной кислоты в цитозиновое основание рС и рТ-C-T-A-G и получить реагенты второго типа — N-замещенные по цитозину производные моно- и пентануклеотида. Предварительно мы убедились, что нагревание водно-спиртового раствора *n*-азидобензойной кислоты в течение 8—10 ч при 80° в темноте не вызывает изменения ее УФ-спектра и при этом полностью сохраняется характерная для арилизидов чувствительность к свету. Соединения (V) и (VI) были получены с выходом 60 и 35% соответственно обработкой натриевой или триэтиламинной соли рС и рТ-C-T-A-G 30—40-кратным избытком ацилирующего агента в смеси диметилформамид — вода при 80° .

В тех же условиях аминогруппы рА и рG не модифицируются. Соединение (V) выделено методом БХ, (VI) — колоночной хроматографией на DEAE-целлюлозе (рис. 3).

Анализ N-ацилированных производных проводили путем аммонолиза концентрированным NH_4OH в течение 3 сут при 20° с последующим количественным определением рС, рТ-C-T-A-G и амида *n*-азидобензойной кислоты (рис. 4, таблица).

Светочувствительность арилизидсодержащих производных мононуклеотидов — соединений (IV) и (V) — определяли по характерному из-

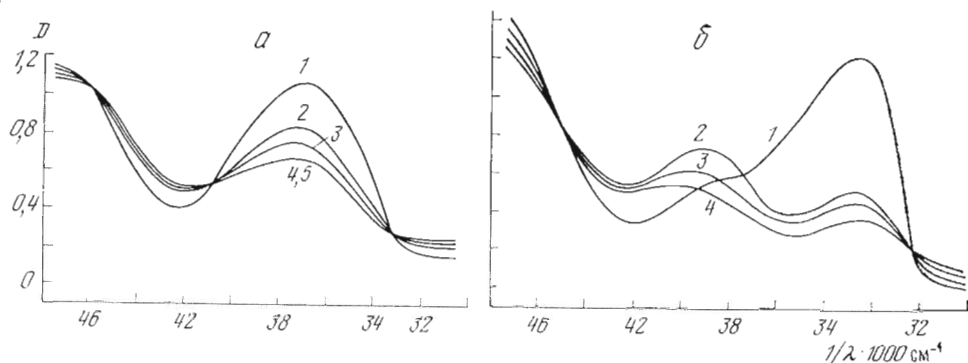


Рис. 5. Фотолиз водного раствора $(n-N_3-C_6H_4-CO-NH-CH_2-CH_2-NH)pT$: 1 — 0; 2 — 8; 3 — 17; 4, 5 — 35 и 75 мин (а) и развС: 1 — 0; 2 — 5; 3 — 25; 4 — 85 мин (б) при облучении в 1-см кварцевой кювете светом с $\lambda \geq 300$ нм. Источник света лампа ДРШ-250, снабженная кварцевым фильтром. Расстояние от лампы до образца 20 см

менению УФ-спектров при облучении их светом с $\lambda \geq 300$ нм. Как видно из рис. 5, при фотолизе наблюдается уменьшение УФ-поглощения соединений (IV) и (V) в области 270 и 306 нм соответственно.

Экспериментальная часть

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге FN-1 в следующих системах растворителей: этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (А), *n*-пропанол — аммиак — вода (55 : 10 : 35) (Б). Вертикальный электрофорез проводили в течение 1,5 ч при напряжении 900 В на приборе Labor (Венгрия) в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония (рН 7,5). УФ-спектры снимали на спектрофотометре Spexord UV VIS (ГДР). Для рТ $\epsilon_{267} = 9600$, рС $\epsilon_{270} = 9100$, рТ-С-Т-А-Г $\epsilon_{265} = 51700$ (без учета гипохромии), *n*-азидобензойной кислоты и ее амида $\epsilon_{272} = 18700$. Использована техника микроколоночной хроматографии, описанная в работе [4].

В работе использовали рТ и рС фирмы Calbiochem (США). Синтез рТ-С-Т-А-Г описан нами ранее [7]. Оксисукцинимидный эфир *n*-азидобензойной кислоты получали по методике [8] с выходом 70%.

Ионообменную колоночную хроматографию проводили на DEAE-целлюлозе DE-32 в Cl⁻-форме. Для градиентной элюции при рН 7,5 использовали раствор NaCl в 7 М мочеvine, содержащей 0,01 М трис-НСl. Для хроматографии при рН 3,5 — раствор NaCl в 7 М мочеvine титровали 6 н. HCl до нужного значения рН.

Все операции с *n*-азидобензойной кислотой и ее производными проводили в отсутствие прямого видимого света.

Фосфамид $(H_2N-CH_2-CH_2-NH)pT-C-T-A-G$ (I). К раствору 1 мкмоль (50 ОЕ₂₆₅) три-*n*-октиламмониевой соли пентануклеотида в 0,5 мл безводного пиридина добавляли 20 мкмоль (3 мкл) MsCOCl. Через 10 мин добавляли 5 мл H₂O и осадок MsCOOH экстрагировали эфиром (5 × 5 мл). Водный слой упаривали при 30° до объема 1—1,5 мл и добавляли 6 мкл (100 мкмоль) этилендиамина. После выдерживания реакционной смеси в течение 3 сут при 37° водный раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 7 М мочеvine, содержащей 0,01 М трис-НСl, рН 7,5. Затем с помощью колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при рН 7,5 в линейном градиенте концентрации NaCl было выделено соединение (I), которое элюировалось при 0,14 М NaCl. Выход 65%. Обессоливание проводили на DEAE-сефадексе А-25 (НСО₃⁻).

$(n-N_3-C_6H_4-CO-NH-CH_2-CH_2-NH)pT-C-T-A-G$ (II). К раствору 0,1 мкмоль (5 ОЕ₂₆₅) амида (I) в 50 мкл 0,5 М бромистого триэтиламмония, рН 8,5, добавляли 100 мкл диметилформамида и 1 мкмоль (0,3 мг) оксисукцинимидного эфира *n*-азидобензойной кислоты, растворенного в 50 мкл диметил-

формамида. Смесь выдерживали 4 ч при 4°. Добавляли 5 мл воды и экстрагировали эфиром избыток ацилирующего агента (5 × 5 мл). Водный слой упаривали и методом БХ в системе Б выделяли соединение (II). Выход 80% *pT-abzC-T-A-G* (VI). К раствору 0,1 мкмоль (5 ОЕ₂₆₅) триэтиламмониевой соли *pT-C-T-A-G* в 25 мкл воды добавляли 50 мкл диметилформамида, затем равными порциями по 25 мкл (через каждые 2 ч) 3 мкмоль (0,9 мг) оксисукцинимидного эфира *p*-азидобензойной кислоты в 75 мкл диметилформамида. Реакцию проводили при 80° в течение 6 ч. Избыток ацилирующего агента и продуктов его гидролиза отделяли методом гель-фильтрации на биогеле Р-2 (размер колонки 0,8 × 30 см, скорость элюции 1,5 мл/ч). Фракцию нуклеотидного материала хроматографировали на ДЕАЕ-целлюлозе в 7 М мочеvine при pH 3,5 (см. рис. 3). Выход соединения (VI) 35%. Обессоливание проводили на сефадексе А-25 (HCO₃⁻).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bayley H., Knowles J. R. (1977) in: *Methods in Enzymol.*, vol. XLVI, pp. 69—114, Acad. Press, N. Y.—London.
2. Knowles J. R. (1972) *Accounts Chem. Res.*, 5, 155—160.
3. Ивановская М. Г., Поздняков П. И., Зельцер И. Э., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1977) Докл. АН СССР, 236, 1022—1024.
4. Грачев М. А. (1973) в кн.: *Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот* (Кюрре Д. Г., Венкстерн Т. В., ред.), с. 104—122, «Наука», М.
5. Власов В. В., Меламед Н. В., Чижиков В. Е., Тукало М. А. (1976) *Биоорган. химия*, 2, 892—897.
6. Николенко Л. Н., Незавибатько В. Н., Семенова М. Н. (1969) *Ж. общ. химии*, 39, 223.
7. Бадашкеева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Кюрре Д. Г., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Шабарова З. А., Шубина Т. Н. (1973) *Химия природн. соединений*, 3, 394—402.
8. Galardy R. E., Craig L. C., Jamieson J. D., Printz M. P. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 3510—3518.

Поступила в редакцию
7.VII.1978

SYNTHESIS OF PHOTOACTIVABLE ARYLAZIDE-CONTAINING PENTADEOXYRIBONUCLEOTIDE DERIVATIVES

IVANOVSKAYA M. G., SOKOLOVA N. I., SHABAROVA Z. A.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Two methods for incorporation of a photoactive] arylazide group into oligodeoxyribonucleotides are described. *p*-Azidobenzoyl derivatives (via the terminal phosphate and the exocyclic amino group of cytosine) of d(*pT-C-T-A-G*) are synthesized. The light sensitivity of the arylazide group is completely retained, which is substantiated by photodestruction of the mononucleotide derivatives.