



УДК 547.963.057:577.6:544

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ III*. ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК-МИШЕНЕЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТАНДЕМОВ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1997 г. Д. Р. Табатадзе, Л. В. Третьякова, А. С. Левина,
Д. В. Пышный, Е. М. Иванова[#], В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 28.10.96 г. Принята к печати 16.01.97 г.

Продемонстрирована высокая эффективность фотомодификации ДНК-мишени 5'-*n*-азидотетрафторбензоильным реагентом на основе тетрануклеотида и его 3'-фосфоэстронового эфира в присутствии пары фланкирующих эффекторов – производных олигонуклеотидов, содержащих на концевых фосфатах N-(2-гидроксиэтил)феназиниевые группировки или остатки холестерина и N-(2-гидроксиэтил)феназиния.

Ключевые слова: производные олигонуклеотидов, эффекторы, модификация ДНК, фотомодификация ДНК.

Как было показано нами ранее, короткие олигонуклеотиды, даже такие, как тетрамеры, в тандеме с эффекторами – олигонуклеотидами и их N-(2-гидроксиэтил)феназиниевыми производными, комплементарными соседним участкам мишени, способны высокоэффективно взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами [2–5]. На примере реакционноспособных производных тетрануклеотидов, несущих остатки алкилирующего амина или противоракового антибиотика блеомицина А5, была продемонстрирована возможность высокоэффективной и сайт-специфичной модификации ДНК-фрагмента в присутствии пары фланкирующих эффекторов [6, 7]. Эффекторный вариант модификации ДНК-мишени основан на том, что реакционноспособные производные олигонуклеотидов с очень коротким адресом способны взаимодействовать с мишенью только в случае образования полного тандемного

комплекса мишень · (эффектор + реагент + эффектор), так как эффекторы стабилизируют комплекс реагента с мишенью.

В роли эффекторов могут применяться также производные олигонуклеотидов, содержащие на концевых фосфатах наряду с феназиниевой группировкой остаток стероида – холестерина или эстрогена [6, 8]. Усиливающее влияние таких гидрофобных эффекторов особенно высоко в случае использования их в тандеме с реагентом на основе эстронового эфира олигонуклеотида, что обусловлено взаиморасположением соседних гидрофобных остатков стероидов реагента и эффектора. Использование стероидных производных олигонуклеотидов для модификации ДНК-мишени особенно значимо, поскольку такие соединения имеют повышенную способность проникать через клеточные мембраны [9] и более устойчивы к действию клеточных нуклеаз [10].

Кроме алкилирующих производных в качестве реакционноспособных олигонуклеотидных реагентов для сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот ранее нами были предложены новые фотоактивные олигонуклеотидные производные, несущие *n*-азидотетрафторбензоильную группу [11–13]. Было показано, что они с высокой эффективностью (70%) в мягких условиях модифицируют фрагменты ДНК по определенному положению мишени.

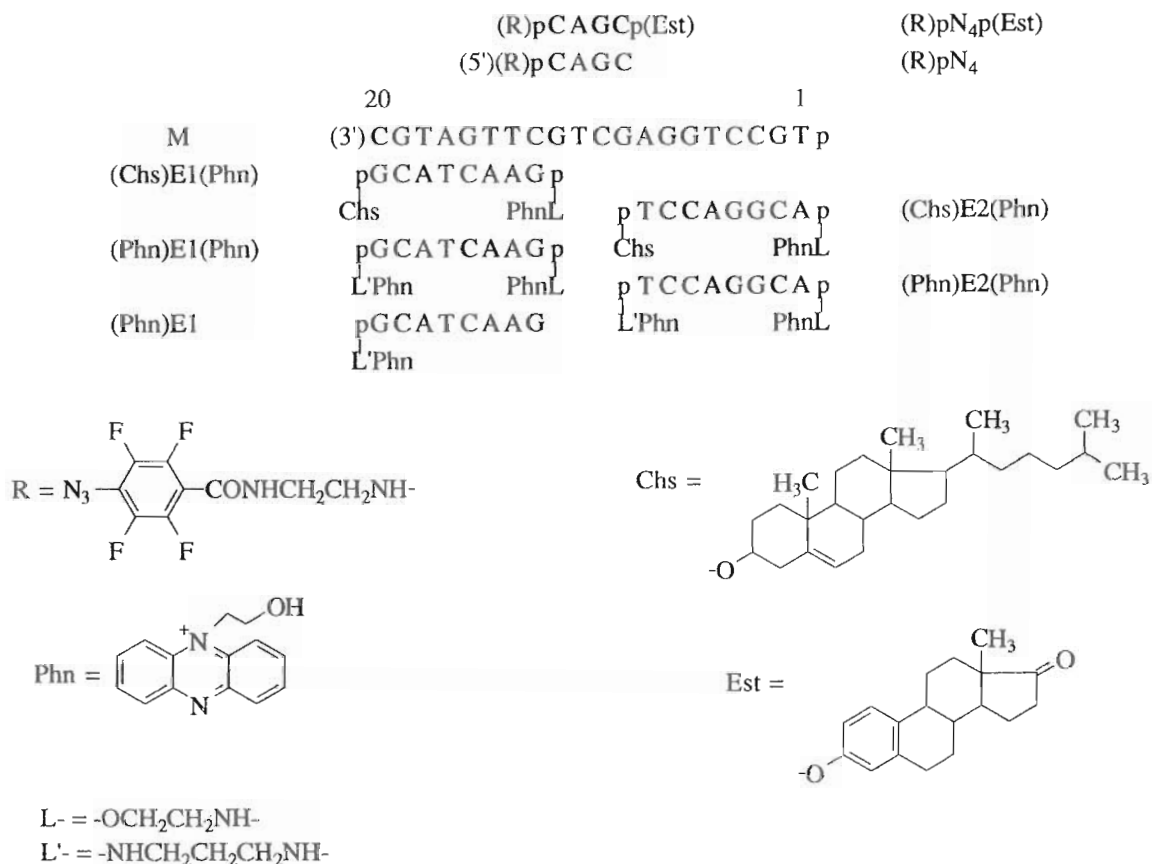
* Сообщение II см. [1].

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты, Chs-OH – холестерин, Est-OH – эстроген, Phn – N-(2-гидроксиэтил)феназиний. Префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (630055, Новосибирск, ул. М. Джалиля, 1, кв. 27; тел.: (383-2) 39-62-75 (раб.); (383-2) 32-87-62 (дом.); факс: (383-2) 35-16-65; e-mail: zarytova@modul.bioch.nsk.su).

Целью данной работы было исследование фотомодификации олигонуклеотидной мишени короткими олигонуклеотидными фотореагентами и их стероидными производными в присутствии фланкирующих эффекторов разных типов.

Исследование проводили на модельной дуплексной системе, использованной ранее [1] при изучении модификации ДНК-мишени реагентами, содержащими алкилирующий амин и остаток блеомицина:



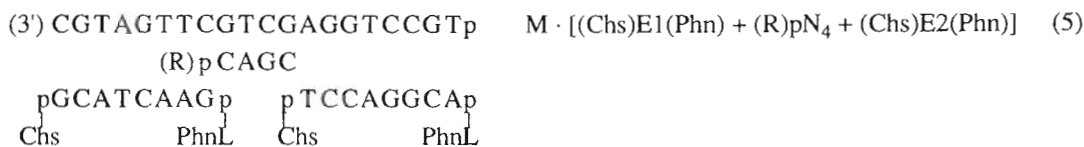
В качестве ДНК-мишени использовали одноцепочечный 20-звенный олигодезоксирибонуклеотид М, в качестве эффекторов – производные октануклеотидов, содержащие либо 3'- и 5'-N-(2-гидроксиэтил)феназиниевые группировки, (Phn)E1(Phn) и (Phn)E2(Phn), либо 3'-N-(2-гидроксиэтил)феназиниевый и 5'-холестериновый остатки, присоединенные по фосфатным группам (Chs)E1(Phn) и (Chs)E2(Phn), а в качестве реагентов – тетра-нуклеотид или его 3'-фосфоэстроновый эфир, содержащие на 5'-концевом фосфате *n*-азидотетрафторбензоильную группировку, (R)pN₄, или (R)pN₄p(Est) соответственно.

Ранее [14] было показано, что олигонуклеотидные реагенты, несущие остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, могут модифицировать ДНК-мишени при облучении светом большой мощности под действием лазера. Поэтому предварительно было установлено, что при облучении дуплекса мишени и дифеназиниевых эффекторов (Phn)E1(Phn) и (Phn)E2(Phn) в условиях проведения

фотомодификации *n*-азидотетрафторбензоильными реагентами деградация мишени не наблюдается. Следовательно, остаток феназиния не может возбуждаться в условиях фотоиндуцирования перфторарилазидных производных и выступать в качестве фотоактивной группировки.

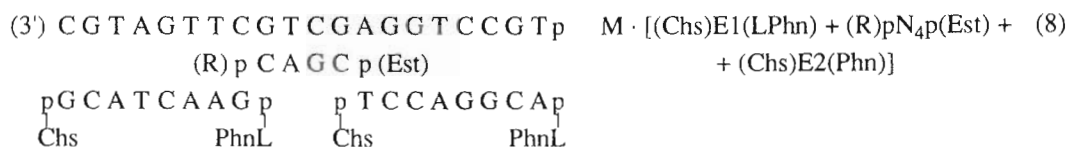
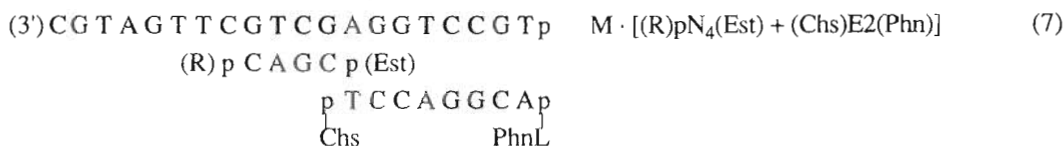
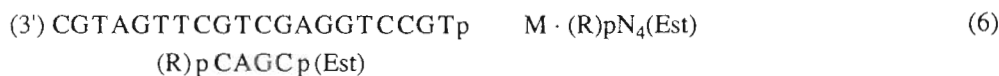
Фотомодификацию ³²P-меченого 20-звенного олигонуклеотида М *n*-азидотетрафторбензоильными производными тетра-нуклеотида и его эстронового эфира проводили при 20 и 37°C. Продукты фотомодификации мишени регистрировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ до и после их обработки пиперидином для определения общей степени и позиционной направленности модификации соответственно.

Как видно из данных, приведенных на рис. 1а (дорожка 1) и в таблице, тетра-нуклеотидный реагент (R)pN₄ не вызывает фотомодификации мишени (комплекс 1), очевидно, вследствие крайне низких гибридизационных свойств тетра-нуклеотида [6].



Реагент на основе эстронового эфира тетрануклеотида (R)pN₄p(Est) (комплекс 6), как и в случае реакции алкилирования, не вызывает фотомодификации мишени в отсутствие эффекторов. Однако ситуация существенно меняется при использовании эффектора (Chs)E2(Phn) (комплекс 7), сте-

роидная группировка которого соседствует с эстроновым остатком реагента, степень модификации при этом даже превышает модификацию в комплексе (4), достигая 55%. Добавление второго эффектора (Chs)E1(Phn) (комплекс 8) практически не оказывает влияния на фотомодификацию.



Как было показано в предыдущих работах [11–13], основным нуклеотидным остатком, модифицируемым перфторарилазидными реагентами, является остаток гуанозина. Фотомодификации во всех рассмотренных случаях подвергается в основном остаток G¹² мишени, расположенный в непосредственной близости от фотоактивной группы, и, в меньшей степени, соседний остаток T¹¹ (рис. 1б). Как видно из таблицы, модификация по основанию T¹¹ в ущерб модификации по остат-

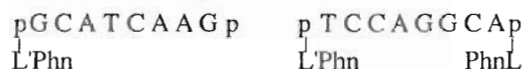
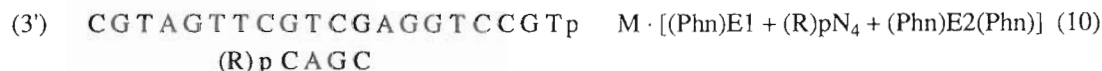
ку G¹², протекает в большей степени при использовании пары эффекторов. Очевидно, сближение феназиниевого остатка эффектора (Phn)E1(Phn) или (Chs)E1(Phn) и фотоактивной группировки реагента (R)pN₄ вынуждает фотоактивную группу в большей степени реагировать не по обычному для нее сайту, а с соседним нуклеотидом и, вероятно, может вызывать снижение общей степени модификации мишени.

Степень фотомодификации мишени *n*-тетрафторарилазидными реагентами на основе тетрануклеотида (R)pN₄ и его 3'-фосфоэстронового эфира (R)pN₄p(Est) в присутствии эффекторов

Комплекс	Эффектор	Реагент	Эффектор	Степень модификации, %		
				общая	G ¹²	T ¹¹
1	–	(R)pN ₄	–	0		
2	(Phn)E1(Phn)	(R)pN ₄	–	13	7	
3	–	(R)pN ₄	(Phn)E2(Phn)	6	5	
4	(Phn)E1(Phn)	(R)pN ₄	(Phn)E2(Phn)	48	36	9
5	(Chs)E1(Phn)	(R)pN ₄	(Chs)E2(Phn)	43	32	8
6	–	(R)pN ₄ p(Est)	–	0		
7	–	(R)pN ₄ p(Est)	(Chs)E2(Phn)	57	47	7
8	(Chs)E1(Phn)	(R)pN ₄ p(Est)	(Chs)E2(Phn)	55	40	12
9	(Phn)E1	(R)pN ₄	–	28	22	5
10	(Phn)E1	(R)pN ₄	(Phn)E2(Phn)	65	52	5

Для проверки этого предположения была проведена модификация мишени в комплексе (9), в котором был использован монофеназиниевый

эффектор (Phn)E1 без остатка N-(2-гидроксиэтил)феназиния, примыкающего при образовании дуплекса к фотогруппировке реагента.



Как видно из таблицы, степень модификации в дуплексе (9) превышает модификацию мишени в присутствии дифеназиниевого эффектора (Phn)E1(Phn) более чем в 2 раза (комплекс 2). Максимальная степень фотомодификации мишени реагентом (R)pN₄ наблюдается в случае использования пары фланкирующих эффекторов – (Phn)E1 и (Phn)E2(Phn) (комплекс 10).

Полученные результаты демонстрируют эффективность использования тандемов производных коротких олигонуклеотидов при проведении фотомодификации мишени, даже при физиологической температуре, в то время как в отсутствие эффекторов это практически невозможно. При конструировании таких тандемов необходимо учитывать, что сближение фотореакционной группировки олигонуклеотидного реагента и остатка красителя эффектора снижает модификацию мишени.

Таким образом, предлагаемый нами подход усиления сайт-специфичности взаимодействия нуклеиновых кислот с олигонуклеотидными реакционноспособными производными за счет использования вместо протяженных олигонуклеотидов тандемов производных коротких олигомеров аналогичной суммарной последовательности может быть применен не только при алкилировании, но и при фотомодификации ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе [16]; pCAGCp(Est) (pN₄(Est)) получали в условиях фосфотриэфирного синтеза в растворе [17]; (PhnLⁿ)pGCATCAAGp(LPhn), (PhnLⁿ)pTCCAGGCAP(LPhn) – по методике [18]. Для получения (Chs)pGCATCAAGp(LPhn), (Chs)pTCCAGGCAP(LPhn) остаток холестерина на 5'-фосфат и аминокликер на 3'-фосфат вводили в олигонуклеотидный блок в условиях фосфотриэфирного синтеза [17]. Феназиниевую группировку присоединяли к амино-

линкеру по методике, описанной в работе [18]. (R)pCAGG, (R)pCAGCp(Est) получали и выделяли обращенно-фазовой хроматографией по методике [11].

Хлорид N-(2-гидроксиэтил)феназиния любезно предоставлен В.Н. Сильниковым (НИБХ СО РАН), оксисукцинимидный эфир 4-азидотетрафторбензойной кислоты – Т.А. Приходько (НИБХ СО РАН).

Концентрацию олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины ϵ_{260} моно- и динуклеотидов [19], амида *n*-азидотетрафторбензойной кислоты ($23.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20]), N-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка ($10 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [18]). Влияние стероидных остатков на ϵ_{260} олигонуклеотидных производных не учитывалось.

Фотомодификацию 20-звенного олигонуклеотида M ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$) фотоактивируемыми производными олигонуклеотидов (R)pCAGC и (R)pCAGCp(Est) (10^{-5} M) (в присутствии 10^{-5} M эффекторов) проводили в буфере 0.1 M NaCl, 0.01 M трис-HCl (pH 7.2), 1 mM EDTA при 20 и 37°C, облучая в течение 5 мин фильтрованным УФ-светом ртутной лампы ДРК-120 на расстоянии 10 см (фильтры БС-12 и УФС-1, мощность $W_{303-365} = 5 \times 10^{-4} \text{ Вт/см}^2$).

5'-³²P-Меченый олигонуклеотид M получали путем обмена 5'-фосфата на Р-радиоактивный аналог [21]. Продукты фотомодификации мишени регистрировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ. Степень общей модификации ДНК-мишени рассчитывали как процентное отношение радиоактивности в пятне, соответствующем продукту модификации, к суммарной радиоактивности в дорожке геля. Позиционную направленность модификации определяли с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ по появлению продуктов деструкции полинуклеотидной цепи в местах модифицированных оснований после обработки облученной реакционной смеси мишени 10% водным пиперидином в течение

ние 50 мин при 95°C [22]. Степень модификации по данному сайту мишени определяли как отношение радиоактивности в соответствующем пятне к суммарной радиоактивности в дорожке геля. Статистическое расщепление олигонуклеотида-мишени по остаткам пуринов получали обработкой препарата ДНК 2% раствором дифениламина в 66% муравьиной кислоте (25°C, 35 мин) [23].

Работа финансировалась грантом государственной программы "Новейшие методы биоинженерии" и грантом РФФИ № 96-04-50191.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пышный Д.В., Подыминогин М.А., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 561–568.
2. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 102–104.
3. Kutyavin I.V., Podyminogin M.A., Vazhina Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Mamayev S.V., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1988. V. 238. P. 35–38.
4. Zarytova V.F. // Nucl. Acid Symp. Ser. № 24. 1991. P. 103–106.
5. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 895–900.
6. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.
7. Воробьев П.Е., Маркушин Ю.Я., Сергеев Д.С., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 22. С. 111–116.
8. Pyshnyi D., Pyshnaya I., Sergeev D., Vorobjev P., Lokhov S., Ivanova E., Zarytova V. // Nucleosides Nucleotides. 1995. V. 14. P. 1065–1068.
9. Boutorin A.S., Gus'kova L.V., Ivanova E.M., Kobetz N.D., Zarytova V.F., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. // FEBS Lett. 1989. V. 254. P. 126–132.
10. Абрамова Т.В., Власов В.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Кулигина Е.А., Райт А.С. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 624–631.
11. Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1190–1198.
12. Levina A.S., Berezovskii M.V., Venjaminova A.G., Dobrikov M.I., Repkova M.N., Zarytova V.F. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 25–27.
13. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Лохов С.Г. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 30–39.
14. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мальцева Т.В., Мамаев С.В., Мальцев В.П. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 595–602.
15. Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A., Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Ivanova E.M., Zarytova V.F. // Pure Appl. Chem. 1996. V. 68. P. 1321–1328.
16. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
17. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Часовских М.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 610–616.
18. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
19. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
20. Levina A.S., Tabatadze D.R., Khalimskaya L.M., Pritchodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova L.A., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1993. V. 4. P. 319–325.
21. Berkner K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3184.
22. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
23. Коробко В.Г., Грачев С.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1420–1422.

Interaction of Short Oligonucleotide Derivatives with Nucleic Acids. III. Photomodification of DNA Targets Using Tandems of Short Oligonucleotide Derivatives

D. R. Tabatadze, L. V. Tret'yakova, A. S. Levina, D. V. Pyshnyi, E. M. Ivanova, and V. F. Zarytova

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

Abstract—High efficiency was demonstrated for the photomodification of a DNA target by a 5'-*p*-azidotetrafluorobenzoyl reagent based on a tetranucleotide and its 3'-phosphoesterone ester in the presence of a pair of flanking effectors. These effectors are oligonucleotide derivatives with N-(2-hydroxyethyl)phenazinium groups or those connected to cholesterol residues at the terminal phosphates.

Key words: oligonucleotide derivatives, effectors, DNA modification, DNA photomodification