

mgr Jolanta Lepczyńska  
Zakład Fizyki Chemicznej  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań  
tel.: (061) 829 13 15  
email: lepczynska@o2.pl

Poznań, 28.VI.2012r.

## **Fotochemia jedno- i dwuniciowych oligodeoksynukleotydów zawierających 5-bromouracyl w sąsiedztwie zasad pirymidynowych**

Modyfikowane zasady kwasów nukleinowych, nukleozydy oraz nukleotydy znajdują szerokie zastosowanie jako leki w chemioterapii nowotworowej, leki przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne a także jako sondy fotochemiczne w badaniach układów biologicznych. 5-Halogenopirymidyny są stosowane od wielu lat jako sondy fotochemiczne w badaniach przestrzennej struktury kwasów nukleinowych (zarówno DNA jak i RNA) a także w badaniach oddziaływania kwasów nukleinowych z białkami z wykorzystaniem techniki fotozszywania (*photocrosslinking*) pozwalającej na identyfikację ważnych funkcjonalnie miejsc kontaktu kwas nukleinowy-białko w kompleksach nukleoproteidowych. Głównym celem większości prowadzonych badań fotochemicznych jest poznanie mechanizmów fotoreakcji jakie zachodzą w kwasach nukleinowych oraz kompleksach nukleoproteidowych. Jedną z częściej stosowanych biologicznych sond fotochemicznych jest 5-bromouracyl. Ponieważ promień Van der Waalsa atomu bromu jest zbliżony do promienia Van der Waalsa grupy metylowej, cząsteczka ta może zastąpić tyminę w nici DNA nie powodując zmian w natywnej strukturze kwasu nukleinowego. Wprowadzenie 5-bromouracylu do DNA lub RNA zwiększa czułość tych kwasów na promieniowanie UV i daje możliwość selektywnego wzbudzenia cząsteczki 5-bromouracylu bez jednoczesnego wzbudzenia pozostałych zasad azotowych. Naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym oligonukleotydów zawierających w łańcuchu 5-bromouracyl prowadzić może do fotoredukcji 5-bromouracylu do uracylu, tworzenia fotoadduktów typu 5,5'-diuracylowego, zrywania nici oligonukleotydowej, tworzenia wiązania kowalencyjnego (*photocrosslinking*) z zasadami, generowania miejsc apurynowych. Fotoreaktywność 5-bromouracylu w DNA jest zależna od sekwencji oligonukleotydowej oraz od konformacji łańcuchów.

Na podstawie przeprowadzonych wcześniej eksperymentów na prostych układach modelowych wykazano, że podczas naświetlania promieniowaniem UV 5-bromouracyl ulega reakcji fotocykloaddycji z uracylem oraz tyminą, analogicznej do fotodimeryzacji pirymidyn tworząc addukt cyklobutanowy z atomem bromu w pozycji 5 zasady pirymidynowej. Należy podkreślić, że jak dotąd brak w literaturze doniesień tworzenia się tego typu adduktów w układach oligonukleotydowych znakowanych 5-bromouracylem. Biorąc powyższe pod uwagę, postanowiono zbadać fotochemię oligonukleotydów zawierających w swej strukturze cząsteczkę 5-bromouracylu w otoczeniu zasad pirymidynowych: uracylu i/lub tyminy w jedno- i dwuniciowych układach DNA.

Naświetlanie oligonukleotydów zawierających 5-bromouracyl sąsiadujący w łańcuchu z jedną lub dwoma zasadami pirymidynowymi, takimi jak uracyl czy tymina prowadzi do powstania fotoproduktów zawierających w cząsteczce dwie połączone ze sobą zasady

azotowe. Stwierdzono, iż w większości badanych układów oligonukleotydowych powstaje jeden główny fotoprodukt, z wyjątkiem sekwencji, w której 5-bromouracyl sąsiaduje z obydwu stron (3' i 5') z dwiema zasadami uracylowymi, gdzie powstają dwa główne fotoprodukty. Reakcja fotochemiczna 5-bromouracylu jest sekwencyjnie zależna, a jej szybkość jest większa w przypadku gdy od strony 3' BrU w łańcuchu oligonukleotydowym znajduje się urydyna. Ponadto, naświetlając oligonukleotyd znakowany 5-bromouracylem w otoczeniu puryny i pirymidyny (adeniny i uracylu) stwierdzono, że 5-bromouracyl reaguje tylko z zasadą pirymidynową, niezależnie od tego czy znajduje się ona po stronie 3' czy 5' łańcucha. 5-Bromouracyl w badanych oligonukleotydach preferuje reakcję z zasadą pirymidynową niż z zasadą purynową, a w przypadku występowania dwóch zasad pirymidynowych preferuje zasadę znajdującą się po stronie 3' łańcucha. Ponadto fotoreakcja przebiega z większą szybkością, gdy po stronie 3' znajduje się urydyna, niż gdy jest nią tymidyna. W układach dwuniciowych powstają takie same fotoprodukty jak w układach jednoniciowych. Obecność nici komplementarnej nie ma wpływu na rodzaj tworzących się fotoproduktów i tylko w niewielkim stopniu wpływa na ich dystrybucję.

Naświetlanie 5-bromouracylu w otoczeniu uracylu w dinukleotydach, prowadzi, w zależności od sekwencji, do powstania dwóch lub trzech fotoproduktów. Tylko w przypadku sekwencji 5'-XU-3' zaobserwowano na podstawie analizy widma absorpcji, widma masowego HR ESI MS oraz konwersji do substratu pod wpływem naświetlania promieniowaniem krótkofalowym tworzenie się fotoadduktu cyklobutanowego bez eliminacji atomu bromu w cząsteczce. Należy podkreślić, że jak dotąd nie obserwowano tworzenia się fotoadduktu cyklobutanowego z atomem bromu w układach dinukleotydowych. W przypadku odwrotnej sekwencji 5'-UX-3' nie zaobserwowano tworzenia się tego typu fotoproduktu, można to tłumaczyć przez szybszą konwersję powstającego adduktu cyklobutanowego do głównego fotoproduktu, dodatkowo sekwencja ta jest bardziej oporna na naświetlanie promieniowaniem UV. Natomiast dla sekwencji zawierającej tymidynę po stronie 3' dinukleotydu zaobserwowano tworzenie dwóch fotoproduktów, z których jednym jest fotoaddukt cyklobutanowy zawierający atom bromu w cząsteczce. Analiza masowa (MALDI TOF MS) głównych fotoproduktów naświetlania heksanukleotydów nie wykazała, obecności adduktów cyklobutanowych zawierających atom bromu w cząsteczce.

Analiza widm NMR oraz widm masowych wykazała, że głównym fotoproduktem naświetlania 5-bromouracylu w otoczeniu zasad pirymidynowych jest addukt typu 6-hydroksy-5,6-dihydro-5,5'-dipirymidynowy. Addukt ten tworzy się w reakcji fotochemicznej 5-bromouracylu zarówno z uracylem jak i tyminą, a grupa hydroksylowa przyłącza się w pozycji C6 do pierścienia pirymidynowego nie zawierającego modyfikacji. W oligonukleotydach głównym fotoproduktem naświetlania jest addukt nie zawierający atomu bromu w strukturze, a jego masa wskazuje na eliminację atomu bromu, której towarzyszy przyłączenie grupy OH. Ten fakt oraz analiza widm absorpcji, widm masowych oraz trawień enzymatycznych głównych fotoproduktów pozwala stwierdzić, że głównym fotoproduktem naświetlania 5-bromouracylu w otoczeniu zasad pirymidynowych zarówno uracylu jak i tyminy w oligonukleotydach jest addukt typu 6-hydroksy-5,6-dihydro-5,5'-dipirymidynowy z uracylem znajdującym się po stronie 3' lub 5' łańcucha oraz z tyminą znajdującą się po stronie 3' łańcucha oligonukleotydowego.

Stwierdzono, że addukt zawierający w pozycji C6 grupę hydroksylową jest nietrwały termicznie i traci cząsteczkę wody z utworzeniem 5,5'-diuracylu. Fotoaddukty powstające podczas naświetlania 5-bromouracylu z uracylem znajdującym się po stronie 5' łańcucha są bardziej nietrwałe i ulegają szybszej konwersji z eliminacją cząsteczki wody niż fotoaddukty z uracylem znajdującym się po stronie 3'. W wyniku fotoreakcji 5-bromouracylu z tyminą powstający fotoaddukt ze względu na obecność grypy metylowej jest stabilny termicznie. W przypadku oligonukleotydów zaobserwowano powstawanie analogicznych fotoproduktów

typu 5,5'-diuracylowych, jak w przypadku dinukleotydów, co potwierdzono za pomocą analizy widm UV i MS. Naświetlanie oligonukleotydów prowadzi do powstawania analogicznych fotoadduktów typu 6-hydroksy-5,6-dihydro-5,5'-dipirymidynowych i 5,5'-diuracylowych jak w przypadku dinukleotydów.

Dodatkowo zaproponowano mechanizm reakcji fotochemicznej 5-bromouracylu z uracylem i tyminą. Zaobserwowano, że w wyniku naświetlania promieniowaniem UV adduktu cyklobutanowego z atomem bromu w cząsteczce dochodzi do powstania adduktu typu 6-hydroksy-5,6-dihydro-5,5'-dipirymidynowego. Na podstawie badań trwałości termicznej i fotochemicznej fotoproduktów stwierdzono, że fotoaddukt cyklobutanowy jest produktem pośrednim tej reakcji i w wyniku addycji cząsteczki wody i eliminacji atomu bromu tworzy się addukt typu 6-hydroksy-5,6-dihydro-5,5'-dipirymidynowy.

W badanych układach nie stwierdzono reakcji debrominacji 5-bromouracylu z wytworzeniem uracylu zarówno w układach di- jak i oligonukleotydowych, jak również w heksamerze zawierającym sekwencję 5'-AXU-3' nie stwierdzono powstawania związku zawierającego resztę rybonolaktanu lub erytrozy.