



УДК 577.113.4/6

© 1993 Е. И. Фролова, Е. М. Иванова,
Н. И. Комарова, А. С. Райт, В. В. Власов,
Г. В. Пономарев*, Г. В. Кириллова*

ПОРФИРИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
1. СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ,
НЕСУЩИХ 2,4-ДИ[α -(2-ГИДРОКСИЭТОКСИ)ЭТИЛ]-
ДЕЙТЕРОПОРФИРИН IX ИЛИ ЕГО МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ
И ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ДНК ЭТИМИ
ПРОИЗВОДНЫМИ

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения РАН;
* Институт биофизики министерства здравоохранения России, Москва

Разработан метод синтеза производных олигонуклеотидов, несущих на 5'- или 3'-концевом фосфате производное диметилового эфира 2,4-ди[α -(2-гидроксиэтоксипропил)этил]дейтеропорфирина IX (DDP) или его металлокомплексы. Показано, что в присутствии окислителей Fe(III)DDP-производные олигонуклеотидов селективно модифицируют одноцепочечную ДНК по ближайшим к сайту образования дуплекса гуанозиновым остаткам. Реакция вызывает образование ковалентных аддуктов между мишенью и реагентом, скрытые модификации, приводящие к расщеплению цепи ДНК после обработки пиперидином, или разрыв цепи ДНК. Эффективность модификации достигает 90%. Установлено, что введение порфириновой группы в олигонуклеотид несколько увеличивает стабильность дуплекса. Кроме того, порфириновая группа повышает эффективность связывания олигонуклеотидов с клетками.

Исследования последних лет доказали принципиальную возможность осуществления направленной химической модификации нуклеиновых кислот реакционноспособными производными олигонуклеотидов и использования таких производных для подавления экспрессии определенных генов [1—4]. В настоящее время применение производных олигонуклеотидов в различных областях молекулярной биологии сдерживается их недостаточной эффективностью, которая определяется в основном природой реакционноспособных групп, используемых при конструировании реагентов. Поэтому актуальной задачей является поиск таких группировок, которые в составе олигонуклеотидного производного могли бы с высокой эффективностью реагировать с нуклеиновой кислотой-мишенью.

В настоящее время синтезирован широкий спектр производных олигонуклеотидов, несущих различные реакционноспособные группы: алкилирующие [5, 6], платинирующие [7], фотоактивируемые [8, 9] и группы, хелатирующие ионы переходных металлов [10—13]. Реагенты первых трех групп реагируют с нуклеиновыми кислотами только стехиометрически. Хелатирующие группы,

Использованы обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC, но префикс «ф» в обозначении олигонуклеотидов опущен. MeIm — 1-метилимидазол, TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, TBAF — тетрабутиламмонийфторид.

содержащие ионы переходных металлов, способны расщеплять нуклеиновые кислоты или модифицировать их гетероциклы многократно, в каталитическом режиме, что делает их привлекательными в плане создания эффективных реакционноспособных производных олигонуклеотидов для воздействия на нуклеиновые кислоты.

Среди хелатов наибольшее внимание привлекают порфирины, которые в силу уникальности своей электронной структуры обладают широким спектром полезных свойств:

1) некоторые типы порфиринов обладают высоким сродством к нуклеиновым кислотам [14];

2) порфирины и ряд их комплексов с металлами эффективно модифицируют нуклеиновые кислоты при активации светом видимого диапазона [15—16];

3) комплексы порфиринов с ионами переходных металлов расщепляют нуклеиновые кислоты в присутствии восстановленных форм кислорода или восстановителей и молекулярного кислорода, причем наблюдается каталитический режим с числом циклов до 5 [17];

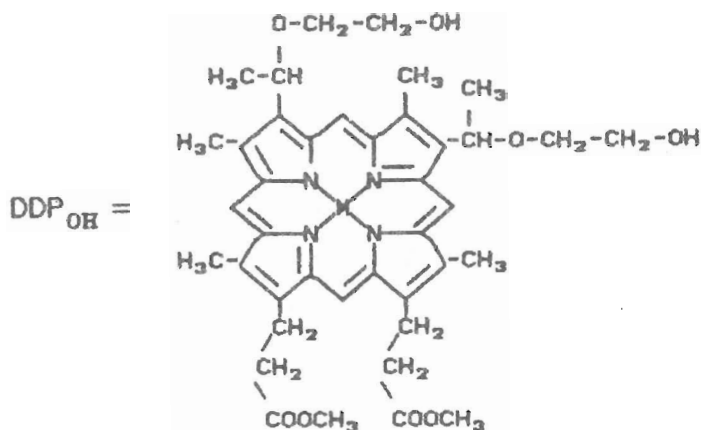
4) порфириновые группы эффективно проникают в клетки [18, 19] и, вероятно, могут способствовать проникновению в клетки олигонуклеотидных производных.

Ранее в нашей лаборатории [20, 21] и в ряде других [22—24] были синтезированы различные порфириновые производные олигонуклеотидов. Некоторые из этих производных способны селективно и эффективно модифицировать нуклеиновые кислоты при химической или фотоактивации. Геминные и дейтерогеминные производные олигонуклеотидов, синтезированные нами [20, 21], модифицировали одноцепочечную ДНК в присутствии пероксида водорода с эффективностью, достигающей 60%. В то же время эффективность модификации ДНК производными олигонуклеотидов, несущих более гидрофобные Fe(III)-метилпирропорфириновые группы [22], в аналогичных условиях не превышала 10%. В работах [23, 24] показано, что производное олигонуклеотида, содержащее Pd(II)-копропорфириновую группу, при активации светом видимого диапазона модифицирует ДНК с эффективностью 30%, в то время как производное, несущее значительно более гидрофобную Pd(II)-октаэтилпорфириновую группу, обладает очень низкой модифицирующей активностью. По-видимому, для создания эффективных сайт-направленных реагентов целесообразно использовать гидрофильные производные природных порфиринов. Известны и синтетические гидрофильные порфирины, содержащие положительно или отрицательно заряженные группы. Предварительные результаты работы [25] по использованию катионных порфириновых производных олигонуклеотидов показали, что такие группы также перспективны в создании ген-направленных реагентов.

Однако до сих пор не существует эффективного метода синтеза порфириновых производных олигонуклеотидов. Использованный нами метод [21], основанный на активации карбоксильной группы порфирина, позволял получать реагенты с выходом, не превышающим 60%.

Существующие в настоящее время методы синтеза производных олигонуклеотидов [26, 27] требуют присутствия в присоединяемом реагенте алифатической амино- или гидроксильной группы. Для природных порфиринов (типа гематопорфирина IX) известны методы модификации, позволяющие вводить алифатические гидроксильные группы одновременно по положениям 2 и 4 макроцикла. Метод получения синтетических порфиринов, несущих такие группы, практически не разработан, к тому же достаточно сложен и дорог.

Нами было синтезировано производное дейтеропорфирина, содержащее две алифатические гидроксильные группы: диметилловый эфир 2,4-ди[α -(2-гидроксиэтокси)этил]дейтеропорфирина IX (DDP_{OH}):



M=2H, Fe, Mn, Co

Введение такого порфирина в олигонуклеотид по 5'- или 3'-концевому фосфату может быть осуществлено в ходе гомогенного фосфотриэфирного синтеза [26].

Чтобы оценить эффективность введения такой порфириновой группы в олигонуклеотид и установить структуру получаемого соединения, был проведен синтез его соответствующего производного на основе дитимидилата:



где p — *n*-хлорфениловый эфир концевого или межнуклеотидного фосфата, Lev — левулинильная защитная группа, DDP — группа DDP_{OH}, сульфонилированная TPS по одной из гидроксильных групп.

В результате синтез удалось провести с выходом на стадии конденсации, превышающим 95%, и временем реакции 20 мин. Поскольку данный порфирин имеет две алифатические гидроксильные группы, в ходе синтеза образуются два изомера. Такие изомеры DDP-производного дитимидилата могут быть разделены хроматографией на силикагеле. Как видно из хроматографического профиля

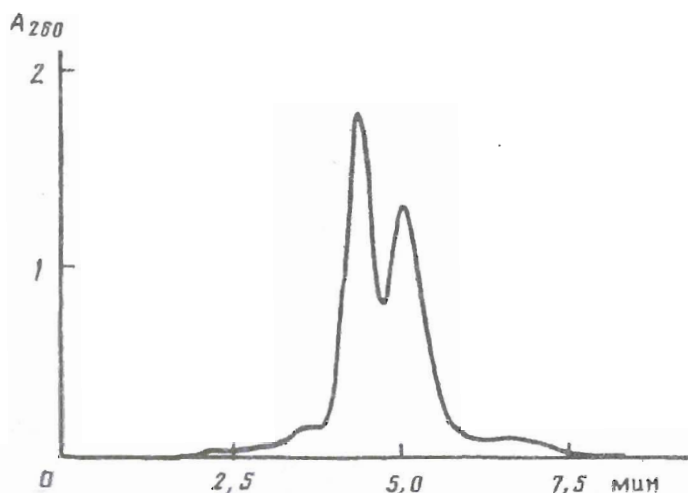
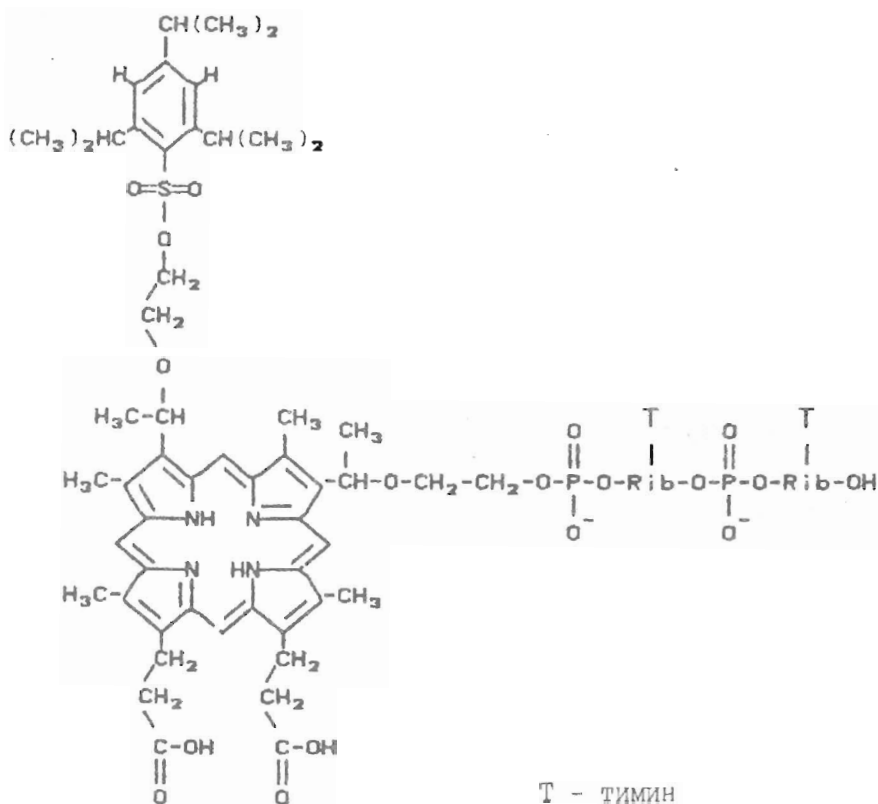


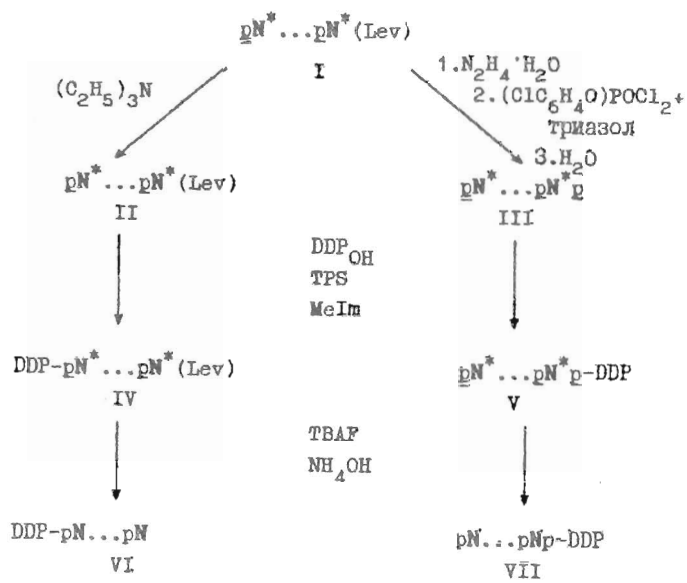
Рис. 1. Хроматографический профиль разделения изомеров DDP-производного дитимидилата на колонке (0,4×62 мм) с силикагелем Silasorb; элюцию проводили 3% раствором этилового спирта в хлороформе, скорость 100 мкл/мин

(рис. 1), изомеры образуются в соотношении 55 : 45. В ^1H -ЯМР-спектрах обоих изомеров кроме сигналов, характерных для протонов тимидинов и DDP_{OH} -группы, регистрируются сигналы протонов остатка TPS. Это свидетельствует о том, что не участвующая в синтезе производного олигонуклеотида вторая OH-группа порфирина сульфонируется TPS. После деблокирования и выделения порфиринового производного дитимидилата в спектре ^1H -ЯМР также регистрируются протоны остатка TPS. Электронный спектр поглощения является практически суперпозицией спектров дитимидилата и порфириновой группы. Эти данные позволяют представить окончательную структуру DDP-производных олигонуклеотидов:



Аналогично могут быть синтезированы DDP-производные более длинных олигонуклеотидов, причем данный метод позволяет вводить порфириновую группу как на 5'-, так и на 3'-конец олигонуклеотидов. Ниже приведена общая схема синтеза таких реагентов.

Для получения производного олигонуклеотида, содержащего остаток DDP на 5'-концевом фосфате, защищенный олигонуклеотид (I) обрабатывали триэтиламином для удаления 2-цианэтильной защиты с 5'-концевого фосфата и вводили в реакцию конденсации с порфирином. В случае получения производных, содержащих порфириновые группы на 3'-концевом фосфате, защищенный олигонуклеотид (I) после деблокирования 3'-ОН-группы фосфорилировали *n*-хлорфенилдихлорфосфатом в присутствии триазола. Полученный олигонуклеотидный блок (II), имеющий на 3'-конце диэфирный фосфат, вводили в реакцию конденсации с DDP_{OH} . Оптимальное время конденсации во всех случаях составляло 15—30 мин. Выход целевого продукта на этой стадии превышал 95% как для свободной порфириновой группы, так и для ее металлокомплексов. От избытка



p - *p*-хлорфениловый эфир концевой или межнуклеотидного фосфата, \underline{p} - 2-цианэтиловый, *p*-хлорфениловый эфир концевой фосфата, N^* - защищенный нуклеозид, N - деблокированный нуклеозид, Lev - левулиновая защитная группа.

порфирина освобождались гель-фильтрацией на сефадексе LH-20. Деблокирование полученных производных олигонуклеотидов проводили в щелочных условиях [26].

Полученные соединения выделяли последовательно ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией. Присоединение порфириновых групп к 5'-концу гексадекануклеотида практически не влияет на время удерживания производного на ионообменном носителе. В обращенно-фазовой хроматографии производные элюируются при значительно большей концентрации ацетонитрила (~40%), чем исходный олигонуклеотид (~20%), что свидетельствует о присутствии гидрофобной порфириновой группы в полученном соединении. Так как DDP_{OH} содержит две несимметричные OH-группы, то при конденсации происходит образование двух изомеров, которые в отличие от производного дитимидилата лишь частично разделяются как при ионообменной, так и при обращенно-фазовой хроматографии. Поэтому в дальнейших исследованиях модификации ДНК такими реагентами использовали смесь двух изомеров.

Электронные спектры поглощения для полученных порфириновых и металлопорфириновых производных олигонуклеотидов представляют собой практически суперпозицию спектров исходных компонентов (рис. 2) с характерным для нуклеиновых кислот поглощением в УФ-области (260—270 нм) и для порфиринов и их металлокомплексов в видимой области с общей для них полосой Soret [28] (~400 нм) и с отличающейся областью (500—650 нм). Электронные спектры поглощения подтверждают, что в условиях синтеза и деблокирования производных олигонуклеотидов не происходит деструкция порфиринового макроцикла.

Влияние введения геминевой группы на комплексообразующие свойства олигонуклеотида оценивали по температуре плавления комплексов, образованных октануклеотидом рТТСССАТТ (дуплекс 1) или его геминевым производным (дуплекс 2) с 12-звенным олигонуклеотидом рТГААТГГГААГА. Оказалось, что введение геминевой группы дополнительно стабилизирует дуплекс: температуры плавления этих комплексов составили 28 и 31° С соответственно.

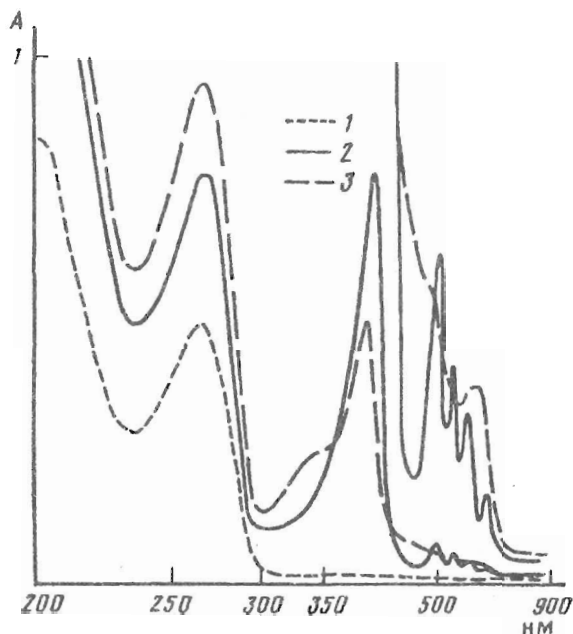


Рис. 2. Электронные спектры поглощения соединений $rTGACCCCTCTCCCATT$ (1), $DDP-rTGACCCCTCTCCCATT$ (2), $Fe(III)DDP-rTGACCCCTCTCCCATT$ (3)

Исследование модификации нуклеиновых кислот $Fe(III)DDP$ -производными олигонуклеотидов проводили с описанной ранее модельной одноцепочечной ДНК (302-нуклеотидным фрагментом кДНК вируса клещевого энцефалита [6, 21]). Как и в предыдущей нашей работе [21], для синтеза реагента был использован гексадекануклеотид $rTGACCCCTCTCCCATT$, комплементарный участку 259—274 этого фрагмента ДНК. $Fe(III)DDP$ -группа была присоединена к 5'-концевому фосфату.

Модификацию ДНК полученным реагентом проводили в условиях образования комплементарного комплекса, в присутствии в качестве донора активного кислорода пероксида водорода. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 10% денатурирующем полиакриламидном геле (рис. 3). Оказалось (рис. 3, 4), что в присутствии реагента и пероксида водорода происходит модификация ДНК и наблюдается образование нескольких продуктов (общий выход ~37%), имеющих меньшую электрофоретическую подвижность, чем исходный фрагмент, и образующихся, по-видимому, в результате ковалентного связывания реагента с мишенью. Кроме того, хотя и с невысоким выходом (3%), происходит прямое селективное расщепление ДНК, которое плохо видно на фотографии, но регистрируется при сканировании радиоавтографа на лазерном денситометре. При исключении из реакционной системы либо реагента (дорожки 2 и 5), либо пероксида водорода (дорожки 3 и 6) модификация ДНК не наблюдается. Обработка модифицированной ДНК пиперидином приводит к исчезновению медленномигрирующих продуктов (дорожка 8) и селективному расщеплению ДНК по остаткам гуанозина 275 и 276, расположенным вблизи геминовой группы при образовании комплементарного комплекса (рис. 3). Кроме того, происходит расщепление в олигогуаниловой области $G^{17}-G^{34}$, содержащей 18 остатков гуанозина, где исследуемый реагент может образовывать несовершенный дуплекс за счет $G \cdot C$ -и $G \cdot T$ -пар. Суммарный выход расщепления по G^{275} , G^{276} и $G^{17}-G^{34}$, выявляемый после обработки пиперидином, составил 67%.

Таким образом, предложенное геминовое производное на основе группы DDP , как и исследованные нами ранее протогеминовые и дейтерогеминовые производ-

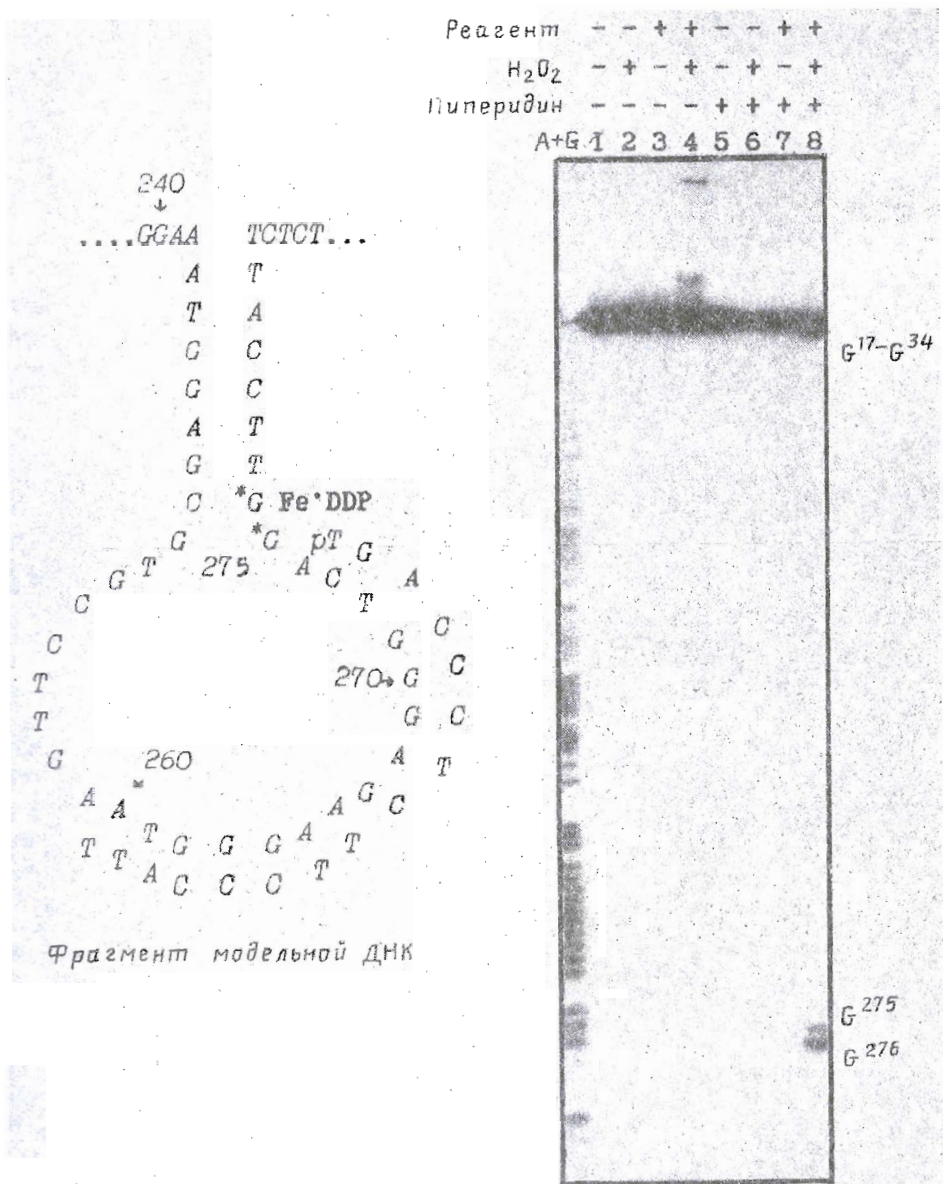


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического анализа продуктов модификации фрагмента ДНК [6, 21] реагентом Fe(III)DDP-pTGACCCTCTCCS: 1, 5 — фрагмент ДНК, инкубированный в буфере состава: 50 мМ трис-НСl, 0,1 М NaCl, 0,1 мг/мл тРНК в течение 1 ч при 25° С; 2, 6 — то же, что и 1, но в присутствии 10⁻³ М Н₂О₂; 3, 7 — то же, что и 1, но в присутствии 5·10⁻⁶ М Fe(III)DDP-pTGACCCTCTCCSATT; 4, 8 — то же, что и 1, но в присутствии 5·10⁻⁶ М Fe(III)DDP-pTGACCCTCTCCSATT и 10⁻³ М Н₂О₂; А + G — расщепление по остаткам А и G методом Максама — Гилберта. В 4—8 проводилась обработка 1 М пиперидином при 90° С в течение 30 мин

ные, вызывает эффективную модификацию ДНК с образованием ковалентных аддуктов и пиперидин-лабильных продуктов, по которым может быть проведено расщепление ДНК. Количественные характеристики модификации ДНК дейтерогеминными и Fe(III)DDP-производными олигонуклеотидов практически не различаются. При одинаковых условиях эти производные гексадекануклеотида,

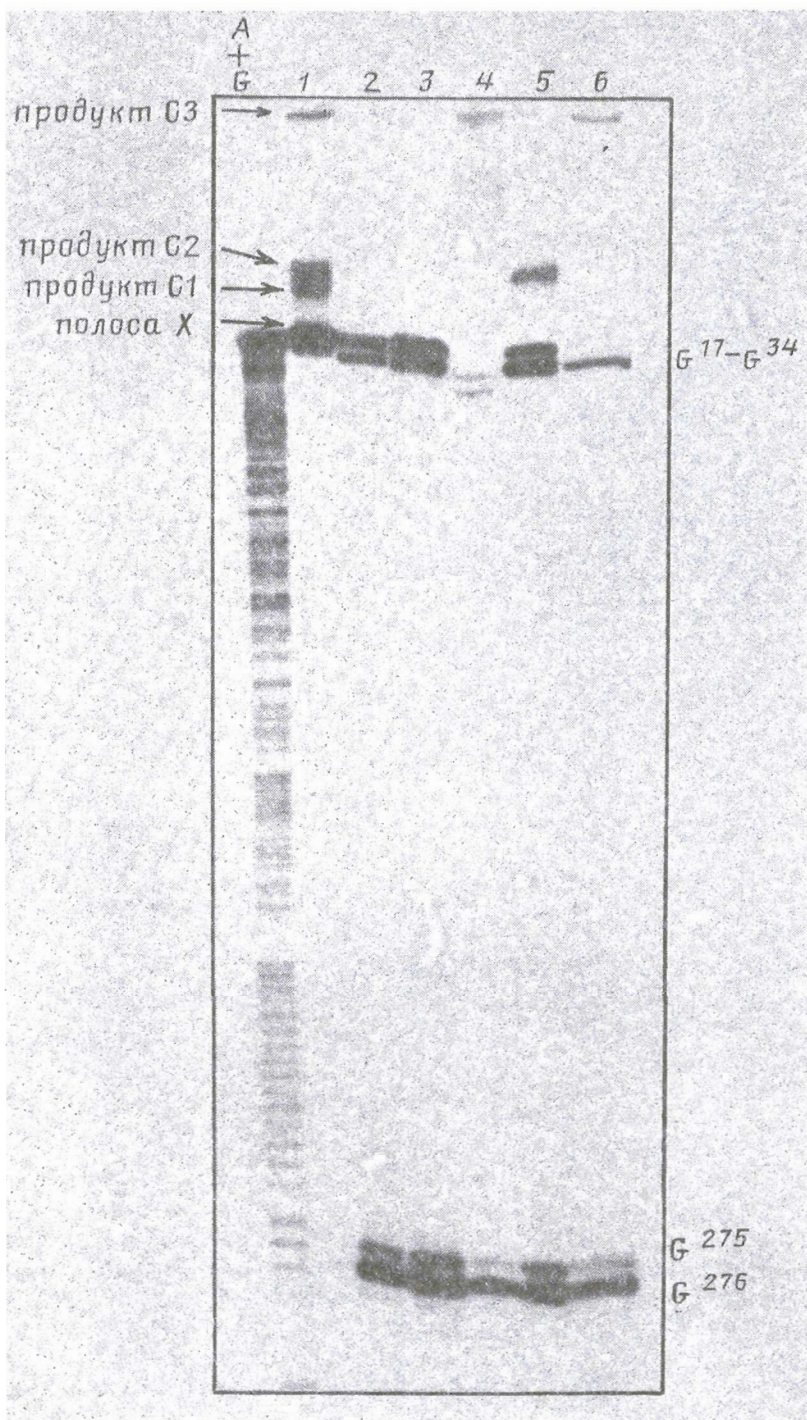


Рис. 4. Радиоавтограф электрофоретического анализа влияния обработки пиперидином на отдельные продукты модификации (дорожка 1), выделенных электрофорезом: 1 — модифицированная ДНК до обработки пиперидином; результаты обработки пиперидином: 2 — модифицированной ДНК, 3 — полосы X, 4 — продукта С1, 5 — продукта С2, 6 — продукта С3. Модификация фрагмента ДНК — см. подпись к рис. 3

Количественный анализ продуктов модификации фрагмента ДНК геминными производными Fe(III)-pTGACCCTCTCCCATТ в присутствии H₂O₂ после их пиперидиновой обработки (по результатам эксперимента, представленного на рис. 4) *

Продукты после расщепления пиперидином	Продукты, подвергаемые пиперидиновой обработке **				
	Суммарная модифицированная ДНК	X (60,0)	C1 (23,2)	C2 (10,5)	C3 (3,4)
C1	—	—	—	—	—
C2	—	—	—	1,7	—
C3	—	—	0,8	—	0,3
X	33,0	18,8	3,2	2,0	—
Расщепление по G ¹⁷ —G ³⁴	15,2	10,5	7,4	2,8	1,3
G ²⁷⁵	8,7	9,1	1,6	0,8	0,4
G ²⁷⁶	42,8	21,8	10,0	3,3	1,5

* Данные приведены в процентах по отношению к суммарному количеству ДНК.

** В скобках у шифров выделенных продуктов модификации приведено их количество в процентах к суммарному количеству ДНК.

несущие Fe-порфириновые группы на 5'-конце, вызывают образование соответственно 44 и 37% ковалентных аддуктов с ДНК-мишенью и 5 и 3% прямых ее разрывов, а после пиперидиновой обработки 60 и 66% модифицированной ДНК расщепляется. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что эффективность модификации ДНК производными олигонуклеотидов, несущими Fe-порфириновые группы природного типа (производные дейтеропорфирина IX), практически не зависит ни от боковых заместителей в порфириновом макроцикле, ни от точки связывания олигонуклеотида с порфирином: положения 6 или 8 в случае геминных и дейтерогеминных производных и положения 2 или 4 в случае DDP-производных. Аналогично получаемые во всех случаях два изомера порфириновых производных олигонуклеотидов также, по-видимому, обладают одинаковой модифицирующей активностью. В то же время DDP-производные могут быть синтезированы практически с количественным выходом, что делает их более перспективными реагентами для дальнейших исследований.

При сравнении эффективности модификации ДНК Fe(III)DDP-производными олигонуклеотидов по данным опытов без использования обработки пиперидином и с использованием такой обработки (эффективности 37 и 67% соответственно) можно предположить, что пиперидин-индуцированное расщепление ДНК происходит не только за счет деструкции ковалентных аддуктов, но и за счет скрытой модификации ДНК, не влияющей на подвижность нуклеиновой кислоты в условиях денатурирующего электрофореза, но приводящей к разрыву цепи ДНК после обработки пиперидином. Чтобы оценить, какие продукты модификации отвечают за пиперидин-индуцированное расщепление нуклеиновой цепи, после модификации фрагмента ДНК реагентом Fe(III)DDP-pTGACCCTCTCCCATТ они были разделены электрофоретически и выделены из геля (рис. 4). Полученные отдельные продукты — ковалентные аддукты (C1, C2, C3) и полоса X — были подвергнуты пиперидиновой обработке. Результаты анализа представлены на рис. 4 и в таблице. Видно, что после обработки пиперидином во всех случаях наблюдается расщепление в области G¹⁷—G³⁴ и по G²⁷⁵ и G²⁷⁶. В случае продуктов C1 и C3 и, в незначительной степени, в случае продукта C2 остается материал, не отличающийся по электрофоретической подвижности от исходной ДНК. При обработке полосы X пиперидином (рис. 4, дорожка 3) расщепляется 69% ДНК.

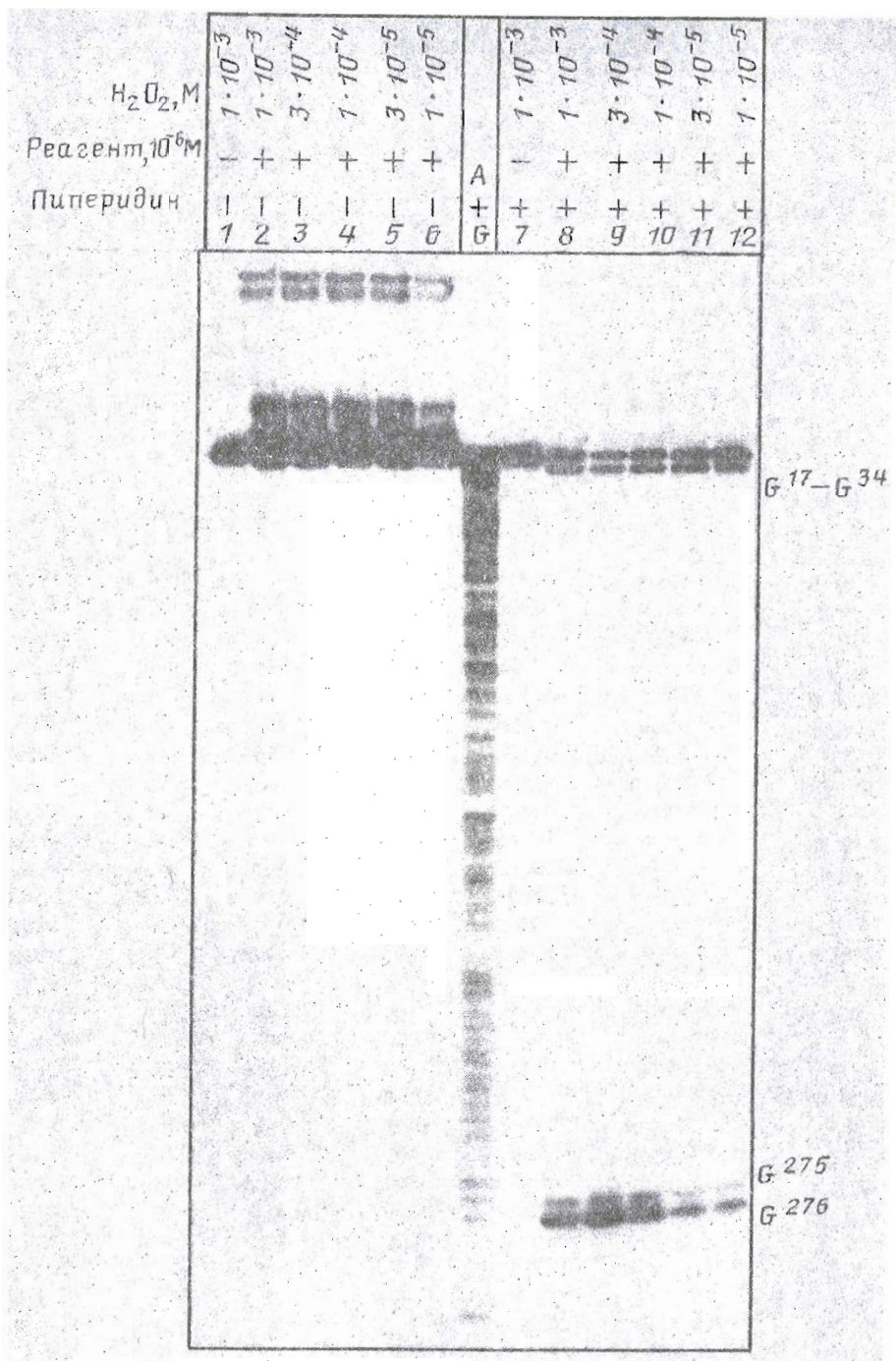
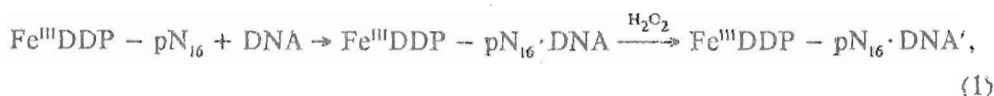


Рис. 5. Зависимость эффективности модификации фрагмента ДНК реагентом $Fe(III)DDP$ - $rTGACCCSTGTCCCATT$ от концентрации пероксида водорода. Модификация фрагмента ДНК — см. подпись к рис. 3. Концентрация реагента была постоянной ($5 \cdot 10^{-6} M$)

Таким образом, эта полоса содержит скрытые повреждения ДНК, являющиеся, по-видимому, результатом окислительной деструкции гуанозинового остатка вблизи места связывания реагента. Учитывая, что эта полоса содержит 60% от исходного материала (дорожка 1), можно предположить, что скрытые повреждения ДНК составляют 41%. Тогда с учетом всех выявленных продуктов модификации (прямое расщепление — 3%, сшивки — 37%, пиперидин-лабильные повреждения — 41%) общий выход модификации составляет в данных условиях 81%. Более низкая степень модификации ДНК, определяемая после обработки пиперидином всей суммы продуктов, объясняется тем, что часть медленномигрирующих продуктов (рис. 4, 4 и 5) после обработки пиперидином переходит в материал, не отличающийся по подвижности от исходной ДНК (больше 32% всех сшивок или 12% исходного материала).

Из представленной на рис. 5 зависимости эффективности модификации от концентрации пероксида водорода видно, что степень модификации увеличивается и достигает 90% при превышении концентрации окислителя над реагентом в 50 раз. Однако при дальнейшем увеличении концентрации H_2O_2 эффективность модификации уменьшается. В исследуемой системе геминное производное олигонуклеотида катализирует три реакции: окисление мишени из комплементарного комплекса, разложение пероксида водорода и автоокисление порфиринового цикла:



где pN_{16} — рTGACCCTCTCCCATТ, DNA — 302-нуклеотидная одноцепочечная ДНК, описанная выше, DNA' — та же ДНК после модификации геминным реагентом.

Таким образом, для достижения максимальной степени модификации необходимо оптимизировать отношение концентраций окислителя и реагента. И из рис. 5 видно, что это отношение не должно быть выше 50.

При повышении концентрации реагента до 0,1 мМ (рис. 6) не происходит заметного увеличения степени модификации ДНК. Наблюдается лишь некоторое изменение соотношения типов продуктов реакции: увеличивается выход прямого расщепления, уменьшается содержание медленномигрирующих продуктов и усиливается неспецифическая модификация. Можно предположить, что в действительности степень модификации ДНК превышает полученные значения, так как мы регистрировали только те виды химической модификации, которые приводят к разрыву ДНК либо непосредственно, либо после обработки пиперидином. Вероятно, некоторые виды модификаций не приводят к разрыву сахарофосфатного остова и не влияют на электрофоретическую подвижность фрагмента ДНК. Такими свойствами, например, должны обладать некоторые продукты окисления гетероциклов.

Принимая во внимание способность порфиринов связываться с клетками [17, 18], можно было ожидать, что введение порфириновой группы в олигонуклеотид повлияет на поглощение этих соединений клетками. На рис. 7 представлены кинетики связывания олигонуклеотида $[^{32}P]pTGACCCTC$ и его производного, несущего геминную группу на 3'-конце $[^{32}P]pTGCCCTCp-Fe(III)DDP$, с различными типами клеток: мышинными фибробластами L929, растущими в монослое, и суспензионными клетками, HeLa, асцитной карциномой Кребс 2 и клетками костного мозга. Видно, что геминная группа увеличивает эффективность свя-

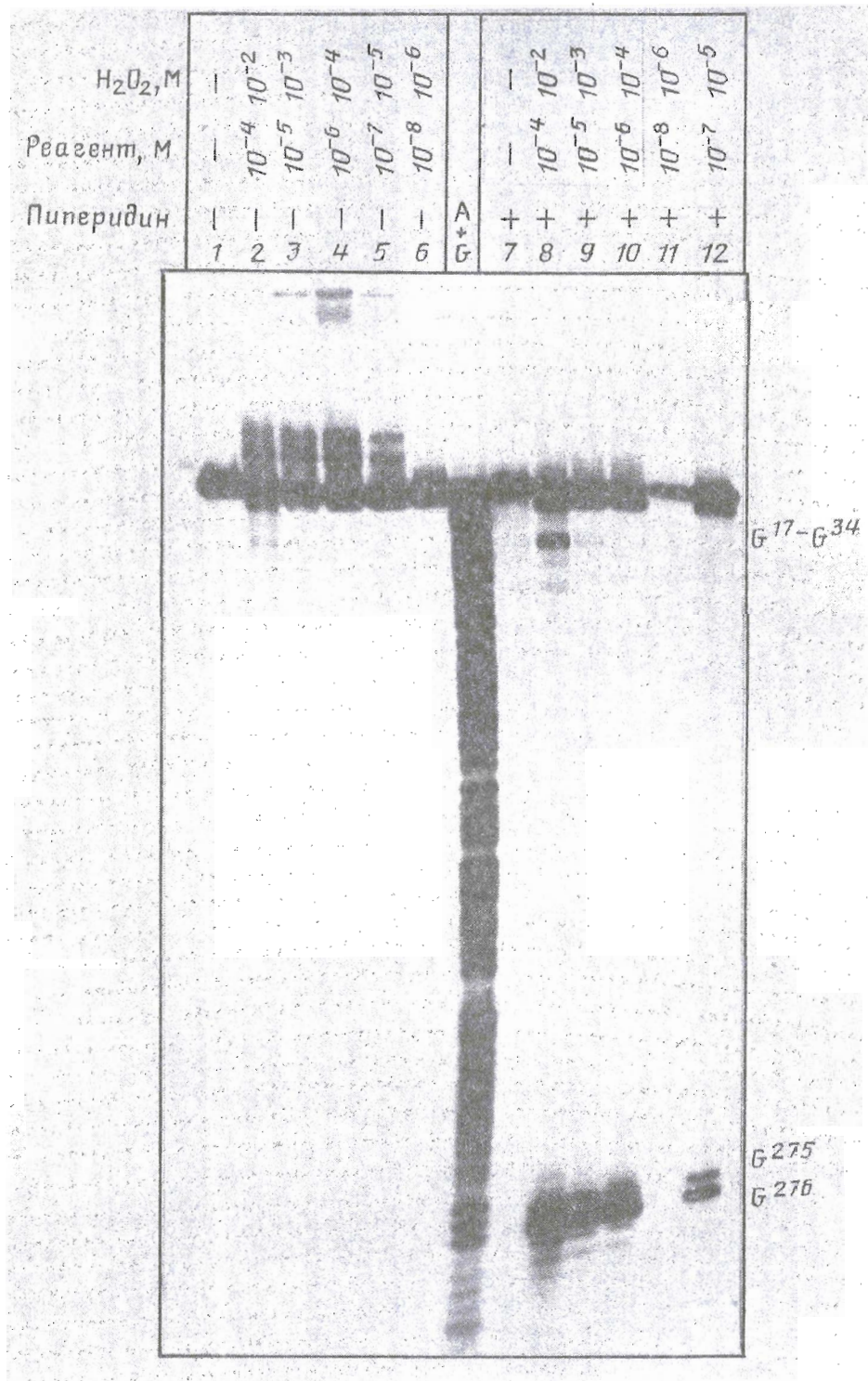


Рис. 6. Зависимость эффективности модификации фрагмента ДНК реагентом $Fe(III)DDP$ - $rTGACCCCTTCCSSAGT$ от его концентрации. Модификация фрагмента ДНК — см. подпись к рис. 3

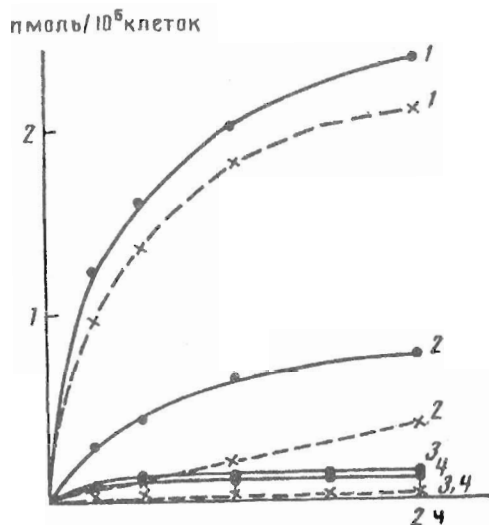


Рис. 7. Кинетика связывания олигонуклеотида $[^{32}\text{P}]\text{pTGACCCTC}$ (штриховые линии) и его геминового производного $[^{32}\text{P}]\text{pTGACCCTC-Fe(III)DDP}$ (сплошные линии) с клетками L 929 (1), HeLa (2), Кребса (3) и костного мозга (4)

зывания олигонуклеотида с клетками. Наибольший эффект (4—5 раз) наблюдается для клеток костного мозга и асцитной карциномы, которые в норме наименее эффективно связывают олигонуклеотиды.

Таким образом, совокупность представленных в работе данных свидетельствует о том, что введение геминовых групп в олигонуклеотиды придает последним ряд свойств, делающих их перспективными для использования в качестве ген-направленных реагентов. Это стабилизация дуплекса, образуемого такими производными, улучшение связывания с клетками и проведение модификации нуклеиновой мишени с эффективностью, достигающей 90%. Вследствие того что Fe(III)DDP-производные могут быть синтезированы практически с количественным выходом и в больших количествах, они наиболее перспективны из всех исследованных производных.

Экспериментальная часть

В работе использовали 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид (опытное химическое производство НИОХ СО РАН), 1-метилимидазол (Ega, Германия). Полностью защищенные олигонуклеотиды pTGACCCTCTCCCATT (pN_6^+) и pTGACCCTC (pN_3^+) были синтезированы Т. В. Абрамовой триэфирным блочным методом в растворе.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия).

Полностью защищенные порфириновые производные олигонуклеотидов выделяли с помощью хроматографии на сефадексе LH-20 или на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, Германия). Деблокированные производные олигонуклеотидов выделяли с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий на хроматографе Altax-232 на колонках с носителями Полисил СА [30] и LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия).

Электронные спектры поглощения олигонуклеотидов и их производных записывали на спектрофотометре Specord M 40 (Carl Zeiss Jena, Германия), спектры $^1\text{H-NMR}$ — на импульсном спектрометре AM-400 (Bruker Physik AG, Германия) на частоте 400 МГц, в качестве стандарта использовали натрий-4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфонат.

Кривые плавления комплементарных комплексов олигонуклеотидов записывали как описано в работе [26].

Диметилловый эфир 2,4-ди[α -(2-гидроксиэтил)оксиэтил]дейтеропорфирина IX (DDP_{OH}). 1 г протогемина IX выдерживали 3 сут в 10 мл уксусной кислоты, насыщенной HBr (d 1,45), после чего растворитель отгоняли в вакууме при 50° С. К остатку приливали 20 мл свежеперегнанного этиленгликоля. Через 12 ч к раствору добавляли 60 мл воды и 10 мл насыщенного водного раствора CH₃COONa. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили, растворяли в 30 мл 5% раствора H₂SO₄ в метаноле. Через 4 ч к реакционной массе добавляли 50 мл воды и 10 мл насыщенного водного раствора CH₃COONa. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили и хроматографировали на колонке с окисью алюминия степени активности 3,5, используя в качестве элюента хлороформ. Выделенное вещество кристаллизовали из спирта и получали 0,9 г (82%) порфирина DDP_{OH}. Найдено, %: С 67,22; Н 7,22; N 7,71. C₄₀H₅₀N₄O₈. Вычислено, %: С 67,20; Н 7,05; N 7,84. Спектр ¹H-ЯМР в CCl₄, δ : 10,556, 10,526(1/2), 10,52(1/2), 10,11, 10,09 (все с, 4Н, мезо-Н); 6,18 (два к, 2Н, СН—СН₂); 4,42 (т, 4Н, СН₂СН₂СО); 3,87—3,83 (м, 8Н, ОСН₂СН₂О); 3,70, 3,695, 3,67, 3,65(2), 3,64 (все с, 18Н, СООСН₃ и СН₃ кольца); 3,30 (т, 4Н, СН₂СН₂СО); 2,29 (два д, 6Н, СН—СН₂); —3,70 (с, 2Н, NH).

Железо(III)- μ -оксо-комплекс диметилового эфира 2,4-ди[α -(2-гидроксиэтил)оксиэтил]дейтеропорфирина IX (FeDDP_{OH}). 300 мг железных опилок кипятили 2 ч в 25 мл уксусной кислоты. Полученный горячий раствор (20 мл) немедленно приливали к раствору 200 мг DDP_{OH} в 50 мл хлороформа. Реакционную смесь кипятили 10—15 мин, затем добавляли 100 мл воды, отделяли органический слой, несколько раз промывали его водой, сушили над Na₂SO₄ и растворитель отгоняли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с окисью алюминия степени активности 4 (элюент — хлороформ) и кристаллизовали из спирта. Получали 190 мг (87,4%) μ -оксо-комплекса железа. Найдено, %: С 61,72; Н 6,23; N 7,31. C₈₀H₉₆N₈Fe₂O₁₇. Вычислено, %: С 61,85; Н 6,23; N 7,21.

DDP-pTpT(Lev). Полностью защищенный дитимидилат (100 мг, 0,1 ммоль) растворяли в 0,5 мл абсолютного ацетонитрила, прибавляли 0,5 мл триэтиламина (3 ммоль), выдерживали 30 мин при 37° С до полного снятия цианэтильной защиты с 5'-концевого фосфата и отгоняли растворитель в вакууме. К остатку добавляли 100 мг (0,15 ммоль) порфирина DDP_{OH}, 150 мг (0,5 ммоль) TPS и сушили в вакууме над P₂O₅. Затем растворяли в 0,5 мл абсолютного пиридина, добавляли 0,1 мл MeIm (0,5 ммоль) и выдерживали 20 мин при 20° С. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе хлороформ — этанол (9 : 1). Продукты реакции выделяли на колонке с силикагелем в градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—7%, 100 мл/мин). Выход целевого продукта после осаждения гексаном составлял 84%.

DDP-pTpT получали обработкой DDP-pTpT концентрированным аммиаком (25%) в течение 2 сут при 20° С. Выделение проводили последовательно ионообменной хроматографией в градиенте концентрации KН₂РO₄, рН 6,0 (0—0,15 М) в 30% растворе ацетонитрила и обращенно-фазовой хроматографией в градиенте концентрации ацетонитрила (0—80%) в воде.

В спектре ¹H-ЯМР в D₂O регистрировались сигналы остатка TPS: 7,21 (синглет, 2,3-СН), 4,15 (секстет, 2,4-С-СН), 2,87 (секстет, 6-С-СН), 1,15 (два дублета, СН(СН₃)₂). pN_{16}^* получали обработкой pN_{16}^* (I) триэтиламиноком как описано в [26].

pN_{16}^*p получали фосфорилированием pN_{16}^* по методике, описанной в [26].

$\bar{R}pN_{16}^*$ и pN_{16}^*pR (R = DDP или Fe(III)DDP). Навески олигонуклеотида (20—30 мг), порфирина DDD_{OH} или Fe(III)DDP_{OH} (30—40 мг), TPS (70 мг) растворяли в 0,5 мл абсолютного пиридина и добавляли MeIm (40 мкл). За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол (8,5 : 1,5). Через 20—30 мин реакционную смесь наносили на колонку с сефадексом LH-20 и элюировали 50% этанолом в хлороформе.

RpN_{16} и $pN_{8}pR$ ($R = DDP$ или $Fe(III)DDP$) получали обработкой соединений RpN_{16} и $pN_{8}pR$ 0,3 М раствором тетрабутиламмонийфторида в 50% водном растворе пиридина в течение 20 ч и концентрированным аммиаком (25%) в течение 44—48 ч при 20° С [26]. Целевые продукты выделяли последовательно ионообменной хроматографией в градиенте концентрации KH_2PO_4 , pH 6,0 (0—0,3 М) в 30% растворе ацетонитрила и обращенно-фазовой хроматографией в градиенте концентрации ацетонитрила (0—80%) в 0,05 М растворе $LiClO_4$.

Введение ^{32}P -метки на 3'-конец фрагмента ДНК осуществляли как описано в работе [5].

Реакцию модификации проводили в буфере 50 мМ трис-НСI (pH 7,5), 0,1М NaCl, 0,1 мг/мл тРНК. Концентрация фрагмента ДНК составляла $\sim 10^{-8}$ М. Концентрации реагента $Fe(III)DDP$ -pTGACCCTCTCCCATТ и пероксида водорода варьировали в зависимости от цели эксперимента. Реакцию инициировали добавлением пероксида водорода, выдерживали 1 ч при 25° С и останавливали осаждением нуклеотидного материала 10—20 объемами 2% раствора $LiClO_4$ в ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали. Для расщепления ДНК по модифицированным участкам осадок растворяли в 20 мкл 10% раствора пиперидина, инкубировали 30 мин при 90° С и осаждали как описано выше. Для электрофоретического анализа осадки во всех случаях растворяли в 3—5 мкл 80% раствора формамида, содержащего красители, и проводили электрофорез в 10% денатурирующем (8 М мочевины) полиакриламидном геле. Гель радиоавтографировали на пленку РМ-В. Для количественной оценки продуктов модификации радиоавтограф сканировали на лазерном денситометре Ultrascan (LKB, Швеция).

Взаимодействие олигонуклеотидов с клетками исследовали методами, описанными в работе [31].

Авторы благодарят С. Г. Лохова за помощь при плавлении комплементарных комплексов олигонуклеотидов и А. В. Лебедева, Т. В. Мальцеву и А. М. Шульгу за запись и анализ спектров 1H -ЯМР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D. G., Vlassov V. V., Zarytova V. F., Lebedev A. V. // *Sov. Sci. Rev. B. Chem.* 1988. P. 13.
2. Cohen J. S. // *Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression.* N. Y.: Macmillan Press, 1989.
3. Uhlmann E., Peyman A. // *Chem. Rev.* 1990. V. 90. № 4. P. 543—584.
4. *Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS* / Ed. Wickstrom E. N. Y.: Wiley-Liss, Inc., 1991.
5. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. // *Tetrahedron Lett.* 1967. P. 3557—3567.
6. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминогин М. А. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 2. С. 240—247.
7. Vlassov V. V., Gorn V. V., Ivanova E. M., Kazakov S. A., Mamaev S. V. // *FEBS Lett.* 1983. V. 162. № 2. P. 286—289.
8. Lee B. L., Murakami A., Blake K. R., Lin S.-B., Miller P. S. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. № 9. P. 3197—3203.
9. Le Doan T., Perrouault L., Praseuth D., Habhouh N., Decout J.-L., Thuong N. T., Lhomme J., Helen C. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 19. P. 7749—7760.
10. Boutorin A. S., Vlassov V. V., Kazakov S. A., Kutiavin I. V., Podymingon M. A. // *FEBS Lett.* 1984. V. 172. № 1. P. 43—46.
11. Chu B. C. F., Orgel L. E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 4. P. 963—967.
12. Chen C. H. B., Sigman D. S. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 18. P. 7147—7151.
13. Le Doan T., Perrouault L., Chassignol M., Thuong N. T., Lhomme J., Helen C. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 20. P. 6736—6739.
14. Fiel R. J. // *J. Biomol. Struct. Dynamics.* 1989. V. 6. № 6. P. 1259—1274.

15. *Dubbelman T. M. A. R., Van Steveninck A. L., Van Steveninck J.* // *Biochim. and biophys. acta.* 1982. V. 719. № 1. P. 47—52.
16. *Praseuth D., Gaudemer A., Verhac J.-B., Krafcic J., Sissoeff N., Guille E.* // *Photochem. and Photobiol.* 1986. V. 44. № 6. P. 717—724.
17. *Bernadou J., Pratiel G., Bennis F., Girardet M., Meunier B.* // *Biochemistry.* 1989. V. 28. № 18. P. 7268—7275.
18. *Battiroli G., Ramponi R., Croce A. C.* // *Photochem. and Photobiol.* 1987. V. 46. № 5. P. 663—667.
19. *Gibbs E. J., Maurer M. C., Zhang J. H., Reiff W. M., Hill D. T., Malicka-Blaszkiwicz M., McKinnier R. E., Siu H.-Q., Pasternack R. F.* // *J. Inorg. Biochem.* 1988. V. 32. № 1. P. 39—65.
20. *Иванова Е. М., Мамаев С. В., Федорова О. С., Фролова Е. И.* // *Биооргани. химия.* 1988. Т. 14. № 4. С. 551—553.
21. *Frolova E. I., Ivanova E. M., Zarytova V. F., Abramova T. V., Vlassov V. V.* // *FEBS Lett.* 1990. V. 269. № 1. P. 101—104.
22. *Le Doan T., Perrouault L., Chassignol M., Thuong N. T., Helene C.* // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 21. P. 8643—8659.
23. *Шойхет К. Г., Федорова О. С.* // *Сиб. хим. журн.* 1991. Вып. 4. С. 32—35.
24. *Fedorova O. S., Savitskii A. P., Shoikhet K. G., Ponomarev G. V.* // *FEBS Lett.* 1990. V. 259. № 2. P. 335—337.
25. *Shoikhet K. G., Kazantsev A. V., Fedorova O. S.* // *Nucl. Acids Res.* 1991. Symp. Ser. № 24. P. 248.
26. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Часовских М. Н.* // *Биооргани. химия.* 1990. Т. 16. № 5. С. 610—616.
27. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Мальцева Т. В., Халимская Л. М.* // *Биооргани. химия.* 1989. Т. 15. № 9. С. 1246—1252.
28. *Порфирины: структура, свойства, синтез / Ред. Аскарлов К. А., Березин Б. Д., Евстигнеева Р. П. и др. М.: Наука, 1985. 333 с.*
29. *Jones P., Prudhoe K., Robson T.* // *Biochem. J.* 1973. V. 135. P. 361—365.
30. *Ястребов С. И., Попов С. Г.* // *Биооргани. химия.* 1986. Т. 12. № 5. С. 661—669.
31. *Vlassov V. V., Kobetz N. D., Rytz A. S., Yurchenko L. V., Bukrinskaya A. G.* // *Adv. Enzyme Regyl.* 1985. V. 24. P. 301—320.

Поступила в редакцию
27.IV.1992

После доработки
14.VII.1992

*E. I. Frolova, E. M. Ivanova, N. I. Komarova, A. S. Rytz,
V. V. Vlassov, G. V. Ponomarev*, G. V. Kirillova**

**PORPHYRIN-LINKED OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES.
1. SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING
2,4-DI[α -(2-HYDROXYETHOXY)ETHYL]DEUTEROPORPHYRIN IX
OR ITS COMPLEXES WITH METALS. INVESTIGATION OF
OXIDATIVE MODIFICATION OF DNA BY THERE DERIVATIVES**

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;

**Institute of Biophysics, Ministry of Health, Moscow*

A method for coupling 2,4-di[α -(2-hydroxyethoxy)ethyl]deuteroporphyrin dimethyl ether (IX), DDP_{DM} and its complexes with metals to the 5'- or 3'-end of oligonucleotides was elaborated. In the presence of an oxidizing agent (H₂O₂), Fe(III)DDP-derivatives of oligonucleotides modified single-stranded DNA. The reaction was strictly site-specific and occurred at two neighbouring guanosine residues. A few types of modification were observed: cross-linking, modification leading to DNA cleavage upon piperidin treatment, and direct chain scission. The total modification yield reached 90%. Covalent attachment of Fe(III)DDP-group to oligonucleotides increased the efficiency of their uptake and the melting temperature of their complementary complexes.