



УДК 547.963.3:577.113.6

## СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК БИНАРНЫМИ СИСТЕМАМИ I. СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ РЕАГЕНТОВ, ВЛИЯНИЕ ИХ СТРОЕНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОДИФИКАЦИИ МИШЕНИ

© 1997 г. М. И. Добриков<sup>#</sup>, С. А. Гайдамаков\*, А. А. Кошкин, Т. И. Гуйнутдинов,  
Н. П. Лукьянчук, Г. В. Шишкин, В. В. Власов

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

\* Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН, Новосибирск

Поступила в редакцию 08.08.96 г.

Осуществлена высокоэффективная сенсibilизированная фотомодификация ДНК-мишени бинарной системой олигонуклеотидных реагентов, комплементарных соседним участкам мишени. Один из олигонуклеотидов несет фотореагент – *n*-азидотетрафторбензамид, второй – сенсibilизатор пирен. Описан синтез олигонуклеотидных производных, изучена скорость и эффективность прямой и сенсibilизированной фотомодификации мишени в зависимости от расположения фотореагента и сенсibilизатора на 3'- и 5'-концевых фосфатах и от длины линкера между сенсibilизатором и олигонуклеотидом-адресом. Более эффективными оказались олигонуклеотидные производные с фотореагентом на 3'-конце (выход ковалентных аддуктов 70%). Скорость сенсibilизированной к УФ-свету (365–390 нм) фотомодификации в 100–1500 раз больше скорости прямой комплементарно-адресованной модификации и снижается при увеличении длины линкера. Во всех случаях модификации подвергается остаток гуанозина мишени, расположенный вблизи фотореагента.

*Ключевые слова:* перфторарилазиды, производные олигонуклеотидов, сенсibilизированная фотомодификация ДНК, перенос энергии.

Реакционноспособные производные олигонуклеотидов считаются наиболее перспективными антисмысловыми реагентами ген-направленного действия [1]. Одной из основных проблем в разработке ген-направленных биологически активных веществ является увеличение специфичности узнавания мишени олигонуклеотидными производными. В физиологических условиях (37°C) для формирования стабильных комплексов достаточна длина олигонуклеотидов в 12–13 оснований. Олигонуклеотиды, имеющие длину 18–20 оснований, необходимую для специфического распознавания уникальных нуклеотидных последовательностей в составе ДНК, способны образовывать многочисленные несовершенные комплексы с частично комплементарными последовательностями [2].

Для увеличения специфичности было предложено присоединять интеркаляторы к коротким олигонуклеотидным адресам [3] и использовать тандемы коротких олигонуклеотидных производ-

ных [4]. Присоединение интеркаляторов – полиароматических углеводов [5], акридиниевых [3], феназиниевых [6] и этидиевых красителей [7] – увеличивает стабильность дуплексов, но в ряде случаев снижает специфичность модификации [7, 8]. Использование тандемов олигонуклеотидов увеличивает стабильность дуплексов и специфичность узнавания ДНК-мишени [4, 6].

Недавно [9, 10] нами был предложен новый подход к увеличению эффективности и специфичности комплементарно-адресованной фотохимической модификации нуклеиновых кислот. Подход основан на использовании пары олигонуклеотидных конъюгатов, комплементарных соседним участкам ДНК-мишени и несущих остатки перфторарилазидов и сенсibilизаторов. Сближенные в составе комплементарного комплекса группы образуют фотореакционноспособный центр, способный к активации длинноволновым УФ-светом за счет безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения с сенсibilизатора на перфторарилазид. Возбужденный таким образом азид вызывает фотомодификацию только той ДНК-мишени, которая находится в составе комплементарного комплекса.

Префикс "d" в обозначениях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

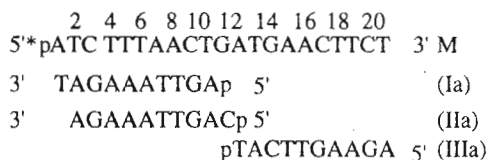


Схема 1.

Использование бинарных олигонуклеотидных систем позволяет проводить фотомодификацию ДНК по последовательностям, которые содержат сближенные участки связывания обоих олигонуклеотидных конъюгатов. Преимуществами таких систем являются повышенная специфичность и эффективность модификации ДНК за счет каталитического характера сенсбилизации [9].

Для конструирования более эффективных бинарных фотореакционноспособных систем необходимо выявление общих закономерностей сенсбилизированной модификации в пространственно организованных комплексах. В настоящей работе мы исследовали зависимость эффективности сенсбилизированной фотомодификации ДНК-мишени от взаимного расположения фотореагента и сенсбилизатора и от длины линкера между олигонуклеотидом-адресом и сенсбилизатором.

Выбранная система состояла из одноцепочечной ДНК-мишени М и комплементарных ей оли-

гонуклеотидных производных, несущих остатки пирина (S) и *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (R). Строение ДНК-мишени (M) и олигонуклеотидов (Ia)–(IIIa) представлено на схеме 1.

В качестве мишени использовался регуляторный участок СУР102 гена цитохрома Р450 [11]. В качестве адресов были выбраны декануклеотиды (Ia)–(IIIa), комплементарные соседним участкам ДНК-мишени: олигонуклеотид (Ia) комплементарен участку 1–10 мишени, олигонуклеотид (IIa) – участку 2–11 и олигонуклеотид (IIIa) – участку 12–21. При одновременном связывании тандемов олигонуклеотидов (Ia) + (IIIa) и (IIa) + (IIIa) с мишенью образуется соответственно комплекс с пропуском в одно звено между ними и комплекс без пропуска. Длина олигонуклеотидов (Ia)–(IIIa) выбрана такой, чтобы температура плавления дуплексов была около 37°C. В физиологических условиях олигонуклеотиды такой длины не способны образовывать несовершенные дуплексы с не полностью комплементарными последовательностями.

Синтез олигонуклеотидов проведен в НИИХ СО РАН триэфирным способом [12]. Синтез олигонуклеотидных производных, несущих по 3'- и 5'-концевым фосфатам пиреновые группы, был осуществлен согласно работе [13] по схеме 2 через образование промежуточных 4-*N,N*-диметиламинопиридиновых производных олигонуклеотидов.

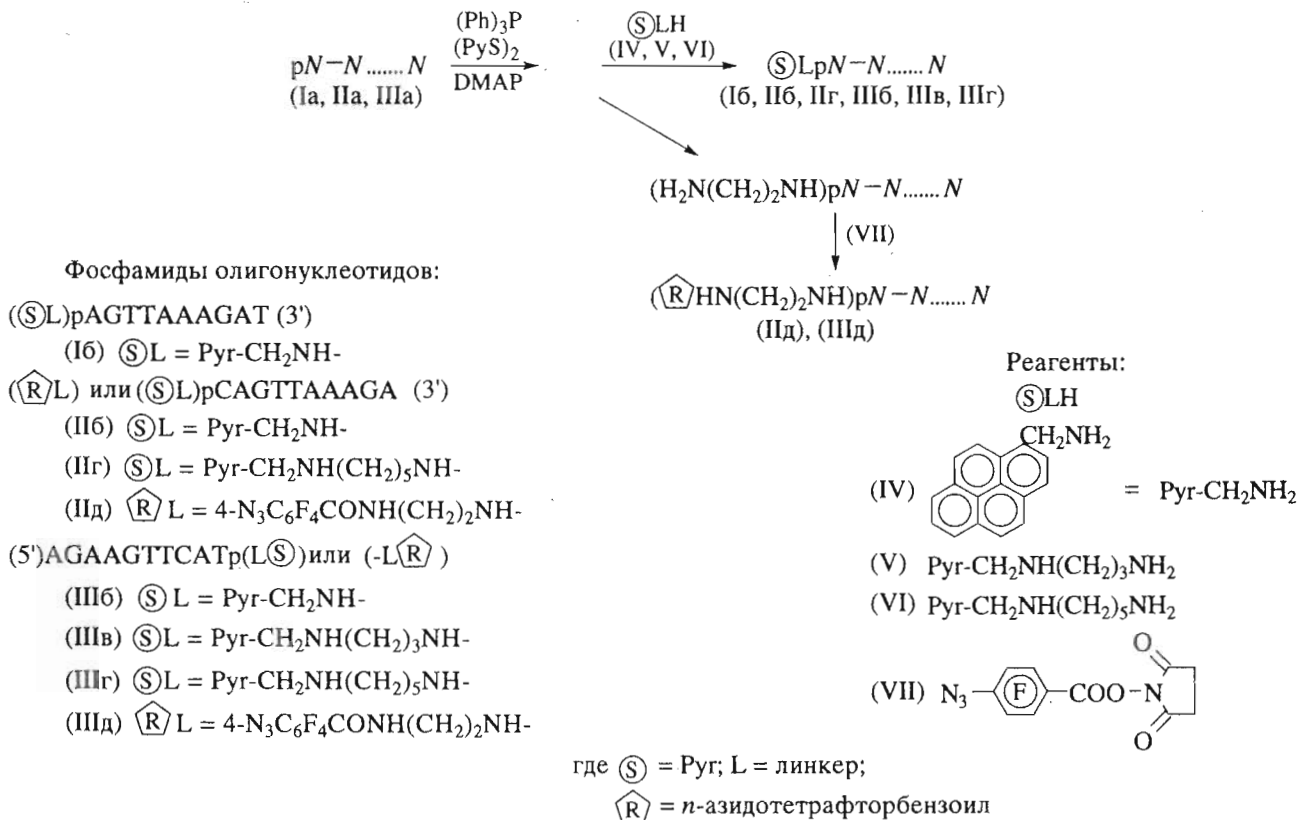


Схема 2. Синтез производных олигонуклеотидов

Таблица I. Физико-химические свойства синтезированных олигонуклеотидов и их производных

Соединения	Время удерживания, мин (ВЭЖХ)	$\epsilon_{260}, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$\lambda_{max}, nm$	$\epsilon_{max}, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$F_{376}, усл. ед.$	$F_{376}$ в комплексах			
						А	Д	Е	И
(IV)	–	24000*	341	37000*	100				
(Ia)	13.5	111000	–	–	–				
(Iб)	18.0	120000*	347	25000*	12				
(IIa)	14.5	109000	–	–	–				
(IIб)	18.5	118000*	347	25000*	11	2.1	1.8		
(IIг)	19.0	117000*	350	23000*	9	1.8	1.5		
(IIд)	17.5	115000*	–	–	–				
(IIIa)	14.0	104000	–	–	–				
(IIIб)	18.0	113000*	347	26000*	11			1.9	1.5
(IIIв)	18.0	112000*	349	24000*	9			1.6	1.3
(IIIг)	18.5	111000*	350	23000*	9			1.5	1.2
(IIIд)	17.0	110000*	–	–	–				

\* Определено по навеске.

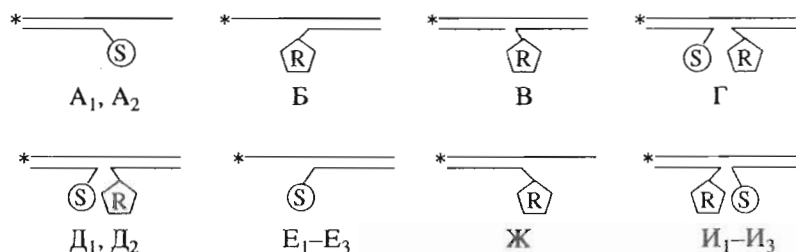
N-Аминоэтилфосфамидные производные олигонуклеотидов (IIa) и (IIIa) были синтезированы согласно [14]. Ацилированием алифатических аминогрупп с помощью N-оксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (VII) из этих производных, как описано в работе [15], были получены соединения (IIд) и (IIIд) с выходом 70–80%. Продукты (IIд), (IIIд), содержащие гидрофобную *n*-азидотетрафторбензамидную группу, элюируются при ВЭЖХ при более высокой концентрации ацетонитрила по сравнению с исходными олигонуклеотидами (IIa), (IIIa) (табл. 1).

В настоящей работе изучена прямая и сенсibilизированная фотомодификация ДНК-мишени олигонуклеотидными производными (IIд) и (IIIд), содержащими фотоактивную *n*-азидотетрафторбензамидную группу, поскольку, как было показано ранее [15–19], именно этот перфторарилазид – наиболее эффективный фотореагент для модификации нуклеиновых кислот и именно такой способ присоединения фотореагента R обеспечивает максимальный выход прямой комплекментарно-адресованной фотомодификации [17].

Для осуществления переноса энергии необходимо, чтобы энергия 0,0-перехода (между самыми нижними колебательными уровнями основного и первого возбужденного электронных состояний) в молекуле сенсibilизатора была больше энергии соответствующего перехода в молекуле азида R и чтобы спектр испускания возбужденного сенсibilизатора ( $S^*$ ) перекрывался со спектром поглощения реагента R [20].

Известно, что энергия 0,0-перехода ароматических азидов бензольного ряда составляет примерно 70 ккал/моль [21] и их малоинтенсивное  $\pi\pi^*$ -поглощение простирается до 430 нм [21, 22]. В связи с этим в качестве сенсibilизатора был выбран пирен, энергия 0,0-перехода которого ( $E_s = 76$  ккал/моль [21]) больше, чем энергия соответствующего перехода азида R, и спектр флуоресценции которого ( $\lambda_{em} = 376$  нм [22]) перекрывается со спектром поглощения азида R. Кроме того, пирен является немутагенным соединением и обладает низкой токсичностью ( $LD_{50}$  250 мг/кг) [23]. Липофильные остатки пирена способствуют проникновению олигонуклеотидов в клетку и увеличивают стабильность дуплексов [23].

Спектрально-люминесцентные свойства 3'- и 5'-пиренильных производных олигонуклеотидов и образуемых ими комплексов с ДНК-мишенью M, представленных на схеме 3, были изучены с помощью УФ- и флуоресцентной спектроскопии (табл. 1). При присоединении остатка сенсibilизатора к 3'- и 5'-концевым фосфатам наблюдается по сравнению со свободным сенсibilизатором (IV) bathochromный сдвиг длинноволновой полосы поглощения пирена, который зависит от длины линкера: в случае короткого линкера в производных (Iб), (IIб) и (IIIб) bathochromный сдвиг составляет 6 нм, в случае среднего в производном (IIIв) – 8 нм и в случае длинного линкера в соединениях (IIг) и (IIIг) – 9 нм. При этом наблюдается и гипохромный эффект, который также возрастает при увеличении длины линкера.



\* —  $^{32}\text{P}$ -метка;  $A_1 = (\text{M} \cdot \text{Пб})$ ;  $A_2 = (\text{M} \cdot \text{Пг})$ ;  $\text{B} = (\text{M} \cdot \text{Шд})$ ;  $\text{B} = (\text{M} \cdot \text{Шд} \cdot \text{Па})$ ;  $\text{Г} = (\text{M} \cdot \text{Шд} \cdot \text{Иб})$ ;  
 $\text{Д}_1 = (\text{M} \cdot \text{Шд} \cdot \text{Пб})$ ;  $\text{Д}_2 = (\text{M} \cdot \text{Шд} \cdot \text{Пг})$ ;  $\text{Е}_1 = (\text{M} \cdot \text{Шб})$ ;  $\text{Е}_2 = (\text{M} \cdot \text{Шв})$ ;  $\text{Е}_3 = (\text{M} \cdot \text{Шг})$ ;  
 $\text{Ж} = (\text{M} \cdot \text{Пд})$ ;  $\text{И}_1 = (\text{M} \cdot \text{Пд} \cdot \text{Шб})$ ;  $\text{И}_2 = (\text{M} \cdot \text{Пд} \cdot \text{Шв})$ ;  $\text{И}_3 = (\text{M} \cdot \text{Пд} \cdot \text{Шг})$ .

Схема 3. Комплексы производных олигонуклеотидов с мишенью М

У полученных олигонуклеотидных производных сенсibilизатора сохраняются максимум флуоресценции при 376 нм и колебательная структура спектра флуоресценции, но, как видно из табл. 1, происходит 8–11-кратное гашение интенсивности флуоресценции ( $F_{376}$ ) по сравнению со свободным пиренил-1-метиламином (IV). Увеличение длины линкера в соединениях (Шв), (Шг) приводит к более сильному гашению флуоресценции ( $F_{376}$ ), чем в производном (Шб).

В комплексах А, Д, Е и И наблюдается дальнейшее гашение флуоресценции. Образование дуплекса  $A_1$  сопровождается 5-кратным гашением флуоресценции по сравнению с исходным олигонуклеотидным производным (Пб) (рис. 1). Полу-

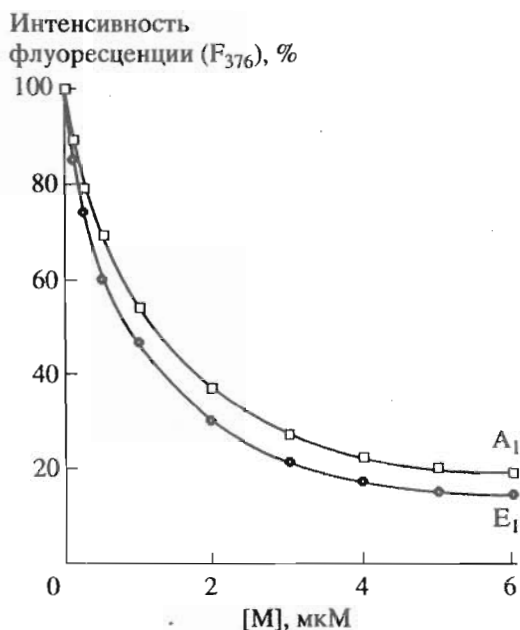


Рис. 1. Гашение флуоресценции олигонуклеотидных производных пирена (Пб) и (Пг) при образовании комплексов  $A_1$  и  $E_1$  в зависимости от концентрации комплементарной им ДНК-мишени. Концентрации производных (Пб) и (Пг) по 1 мкМ.

ченные результаты согласуются с литературными данными по аналогичному изменению спектрально-люминесцентных свойств 5'-пиренильных производных дезокси- [23] и рибоолигонуклеотидов [24] и свидетельствуют о наличии сильных взаимодействий между пиренильной группой сенсibilизатора и гетероциклическими основаниями одно- и особенно двухцепочечных олигонуклеотидов. Последующее связывание олигонуклеотидного производного (Шд) с образованием комплекса  $D_1$  снижает интенсивность флуоресценции по сравнению с дуплексом  $A_1$  примерно на 15%.

При связывании 3'-олигонуклеотидного производного пирена (Шб) с матрицей в дуплекс  $E_1$  происходит 7-кратное гашение его флуоресценции. При последующем связывании дуплекса  $E_1$  с олигонуклеотидным производным фотореагента (Пд) в комплекс  $I_1$  интенсивность флуоресценции снижается на 20%. Аналогично для других 3'-производных (Шв) и (Шг).

В итоге в комплексах Д и И интенсивность флуоресценции ( $F_{376}$ ) пиренильного остатка в 60–80 раз ниже по сравнению со свободным пиренил-1-метиламином (IV).

На рис. 2 представлены кинетические данные по накоплению ковалентных аддуктов сшивки реагента (Шд) с ДНК-мишенью в ходе прямой и сенсibilизированной фотомодификации при расположении фотореагента на 3'-конце олигонуклеотида.

Сравнивая прямую фотомодификацию в комплексах Б и В, можно констатировать, что появление второго олигонуклеотида в комплексе В лишь незначительно увеличивает скорость и эффективность фотомодификации (кривые 1 и 2). Это находится в соответствии с ранее полученными результатами по комплементарно-адресованной фотомодификации ДНК тандемами олигонуклеотидных производных [17].

При сенсibilизированной фотомодификации в комплексах Г и Д добавление второго олигонуклеотида, несущего сенсibilизатор, приводит к

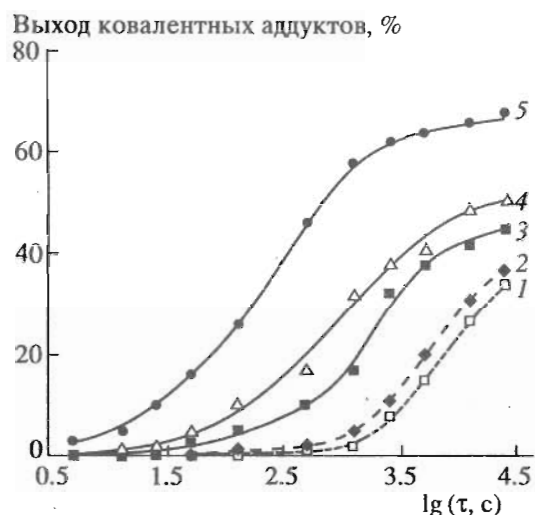


Рис. 2. Выход ковалентных аддуктов присоединения реагента (Шд) к ДНК-мишени при прямой (1, 2) и сенсibilизированной (3–5) фотомодификации в комплексах Б (1), В (2), Г (4), Д<sub>1</sub> (5) и Д<sub>2</sub> (3).

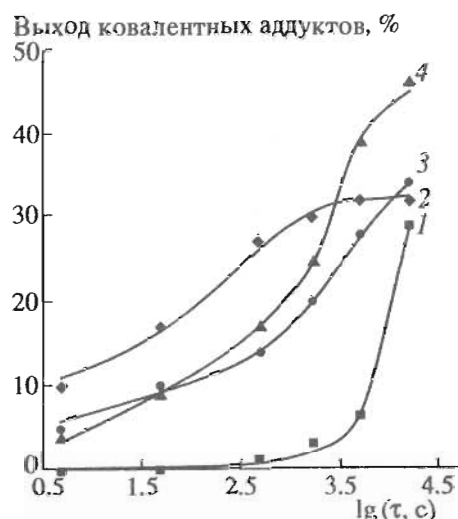


Рис. 3. Выход ковалентных аддуктов присоединения реагента (Шд) к ДНК-мишени при прямой фотомодификации в комплексе Ж (1) и сенсibilизированной фотомодификации в комплексах И<sub>1</sub> (2), И<sub>2</sub> (3) и И<sub>3</sub> (4).

значительному увеличению как скорости, так и эффективности фотомодификации. Так, в комплексе Г, имеющем промежуток между комплементарными матрице олигонуклеотидами (1б) и (Шд) (кривая 4), начальная скорость фотомодификации возрастает в 20 раз по сравнению со скоростью прямой фотореакции в комплексе В, а максимальный выход ковалентных аддуктов после 3 ч облучения ( $\lg \tau = 4.25$ ) увеличивается с 38 до 50%.

При фотомодификации мишени в комплексе Д<sub>1</sub>, в котором олигонуклеотидные производные фотореагента (Шд) и сенсibilизатора (Пб) располагаются вплотную, начальная скорость модификации возрастает в 100 раз (кривая 5) по сравнению с начальной скоростью прямой фотомодификации в комплексе В, а максимальный выход ковалентных аддуктов увеличивается до 70%.

При сенсibilизированной фотомодификации в комплексе Д увеличение линкера у сенсibilизатора (кривые 5, 3) от двухзвенного остатка  $-\text{CH}_2\text{NH}-$  (соединение (Пб) до восьмизвенного  $-\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}-$  (Пг) приводит к снижению начальной скорости фотомодификации в 15 раз и уменьшению степени модификации до 46%. Видно, что при этом и скорость, и степень фотомодификации ниже, чем в комплексе Г (М · Шд · Пб) с коротким двухзвенным линкером между олигонуклеотидом и сенсibilизатором (кривая 4).

Более подробно влияние длины линкера на начальную скорость и эффективность сенсibilизированной фотомодификации было изучено в комплексах Ж и И. Полученные данные (рис. 3) свидетельствуют, что начальная скорость и выход

ковалентных аддуктов сенсibilизированной фотомодификации в комплексах И<sub>1</sub>–И<sub>3</sub> (кривые 2–4) выше, чем прямой в комплексе Ж (кривая 1), и сильно зависят от длины линкера. В комплексе И<sub>1</sub> с коротким линкером (кривая 2) начальная скорость сенсibilизированной реакции больше в 1500 раз, а максимальный выход ковалентных аддуктов при облучении 2.5 ч равен 30% и лишь немного выше, чем для прямой фотореакции в дуплексе Ж. Ускорение сенсibilизированной фотореакции может быть обусловлено максимально близким расположением сенсibilизатора и фотореагента. Увеличение длины линкера приводит к снижению начальной скорости сенсibilизированной фотомодификации и к увеличению степени модификации в комплексе И<sub>2</sub> до 33% (кривая 3) и в комплексе И<sub>3</sub> до 47% (кривая 4). Такое изменение степени модификации можно объяснить тем, что близкое расположение остатков сенсibilизатора и реагента снижает выход ковалентных аддуктов за счет взаимных стерических препятствий.

Суммируя данные, представленные на рис. 2 и 3, можно сделать вывод, что при присоединении фотореагента по 3'-концевому фосфату олигонуклеотида (Ша) максимальная степень сенсibilизированной фотомодификации (70%) значительно больше, чем при присоединении по 5'-концевому фосфату олигонуклеотида (Па) (47%). Видимо, это обусловлено более благоприятным для фотомодификации в дуплексе Д расположением фотореагента, присоединенного к 3'-концевому фосфату олигонуклеотида. Полученные данные отличаются от ранее представленных результатов [17] по прямой фотомодификации ДНК тандемами олигонуклеотидных фотореагентов, где показано,

**Таблица 2.** Позиционная направленность прямой и сенсibilизированной фотомодификаций ДНК-мишени после обработки пиперидином

Расположение фотореагента	На 5'-конце					На 3'-конце			
	прямая	сенсibilизированная			прямая	сенсibilизированная			
Вид фотомодификации		И <sub>3</sub>	И <sub>2</sub>	И <sub>1</sub>	Б	В	Г	Д <sub>2</sub>	Д <sub>1</sub>
Комплексы	Ж	И <sub>3</sub>	И <sub>2</sub>	И <sub>1</sub>	Б	В	Г	Д <sub>2</sub>	Д <sub>1</sub>
Степень модификации после обработки пиперидином, %	32	36	39	44	43	54	65	47	73
Нерасщепившиеся аддукты, %	9	12	11	10	24	31	30	18	29
Продукты расщепления пиперидином по основаниям нуклеотидов	A <sup>12</sup>	4	0	0	0	0	2	2	2
	G <sup>11</sup>	18	23	27	31	18	23	31	25
	T <sup>10</sup>	1	1	1	1	1	0	2	2

что эффективность фотомодификации мишени мало зависит от того, к какому концу олигонуклеотида была присоединена перфторазидогруппа. Следует отметить, что в обоих случаях использовались разные олигонуклеотиды, а максимально достижимая степень модификации ДНК-мишени может зависеть от ее последовательности.

Для получения информации о позиционной направленности фотомодификации реакционные смеси после облучения обрабатывали пиперидином в условиях, принятых для расщепления ДНК по алкилированным по N7-положению остаткам гуанозина. При этом, как и в предыдущих работах [15–19], наблюдали расщепление мишени по модифицированным сайтам (табл. 2). Модификация ДНК-мишени перфторарилазидными фотореагентами включает несколько типов повреждений: скрытую модификацию, не приводящую к образованию ковалентных аддуктов и проявляющуюся при обработке реакционных смесей пиперидином, и образование ковалентных аддуктов присоединения адреса к мишени, как пиперидин-лабильных, так и пиперидин-стабильных [15–17].

Позиционная направленность пиперидин-лабильной фотореакции во всех случаях одинакова – модификация преимущественно подвергается остаток G<sup>11</sup> мишени. Степень модификации после обработки реакционной смеси пиперидином, как правило, несколько выше, чем выход ковалентных аддуктов (рис. 2 и 3), за счет существования скрытой пиперидин-лабильной модификации мишени, но вклад ее невелик (5–7%).

При присоединении фотореагента по 5'-концевому фосфату степень суммарной (44%) и пиперидинзависимой по остатку G<sup>11</sup> (31%) модификаций для сенсibilизированной фотореакции больше, чем для прямой (32 и 18% соответственно), и возрастают при уменьшении длины линкера (36 → 39 → 44 и 23 → 27 → 31% соответственно). При фотомодификации ДНК-мишени ре-

агентом, присоединенным по 3'-концевому фосфату, наблюдается аналогичная зависимость.

Сравнивая результаты фотомодификации мишени олигонуклеотидными производными (Пд) и (Шд), можно сделать вывод, что при присоединении фотореагента по 3'-концевому фосфату степень суммарной фотомодификации и выход нерасщепившихся аддуктов больше, чем для фотореагента, присоединенного по 5'-концевому фосфату.

В целом при сближении остатков реагента и сенсibilизатора в комплексе Д по сравнению с комплексом Г и при уменьшении длины спейсера в комплексах Д и И суммарная степень модификации значительно возрастает.

Для достижения максимальной эффективности модификации наиболее перспективно присоединение фотореагента к 3'-концевому фосфату олигонуклеотида (Ша), а сенсibilизатора – к 5'-концевому фосфату олигонуклеотида (Па) через самый короткий спейсер и использование комплексов типа Д. Такой подход дает возможность увеличить степень модификации примерно в 2 раза по сравнению с комплексом И.

С точки зрения максимальной скорости фотомодификации представляет интерес сенсibilизированная реакция в комплексе И<sub>1</sub> с фотореагентом, присоединенным по 5'-концевому фосфату, и сенсibilизатором, присоединенным к 3'-концевому фосфату через максимально короткий линкер. В этом случае есть возможность добиться 1500-кратного увеличения начальной скорости фотомодификации по сравнению с прямой модификацией в дуплексе Ж.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 1,3-диаминопропан, 1,5-диаминопентан (Ferak, Германия), литийалюмогидрид (Fluka, Швейцария), реактивы отечественного производства.

ИК-спектры снимали на приборе UR-20 в таб-летках КВг. Запись УФ-спектров и измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометрах UV-2100 (Shimadzu, Япония) и Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Германия). Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР записаны на приборе Bruker-200A, внутренний стандарт – гексаметилендисилоксан. Хроматографический контроль проводили на пластинах Silufol UV-254 в системах трет-бутиловый спирт–метилэтилкетон–муравьиная кислота–вода, 8 : 6 : 3 : 3 (А), хлороформ–метанол, 10 : 1 (Б). Температуру плавления определяли в запаянных капиллярах на установке “Кристалл”. Скорость нагрева 0.3°С/мин.

Для выделения полученных олигонуклеотидных производных применяли метод ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Waters (США) в системе I (колонка 25 × 0.4 см, сорбент Nucleosil RP-18, 5–20 мкм (Merck, Германия), линейный градиент концентрации ацетонитрила в 0.05 M LiClO<sub>4</sub> от 0 до 40% за 40 мин, скорость элюции 3 мл/мин).

1-Пиренальдегид получали по методике [25], 1-пиренальдоксим и N-(5-аминопентил)-1-пиренилметиламина гидрохлорид (VI) – по [26]. ИК-, УФ-, <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры соответствуют ожидаемым структурам.

**1-Пиренилметиламина гидрохлорид (IV).** К суспензии 0.064 г (0.3 ммоль) LiAlH<sub>4</sub> в 20 мл абс. эфира (ток аргона) прибавляли по каплям раствор 0.5 г (0.25 ммоль) 1-пиренальдоксима в 50 мл абс. эфира. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при 20°С, осадок отфильтровывали, промывали последовательно 10 мл эфира, 5 мл насыщенного водного раствора Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 мл воды. Фильтраты объединяли, органический слой отделяли, промывали 5 мл насыщенного водного раствора Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, сушили над сульфатом натрия. Растворитель упаривали, желто-коричневый остаток растворяли в 50 мл абс. спирта. Спиртовой раствор насыщали газообразным HCl до полного осаждения продукта. Осадок отфильтровывали, сушили и перекристаллизовывали из абс. метанола. Выход 0.2 г (33%). Т. пл. 241.5–244.5°С (т. пл. 244–250°С [26]). R<sub>f</sub> 0.42 (Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>, δ, м. д.): 4.82 (2H, с, PугCН<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 8.13–8.88 (9H, м, Pуг). УФ-спектр, λ<sub>max</sub>, нм (ε): 242 (62000), 276 (42500), 342 (37000).

**N-(3-Аминопропил)-1-пиренилметиламина дигидрохлорид (V)** получали аналогично способу [26]. Выход 40%. Т. пл. 234.5–235.5°С. R<sub>f</sub> 0.36 (А). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O, δ, м. д., J, Гц): 2.01 (2H, м, СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>), 2.99 (2H, т, СН<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, J 8), 3.42 (2H, т, NHСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>, J 8), 4.47 (2H, с, PугCН<sub>2</sub>NH), 7.46–8.12

(9H, м, Pуг). УФ-спектр, λ<sub>max</sub>, нм (ε): 242 (51500), 276 (34000), 342 (33000).

**N-(5-Аминопентил)-1-пиренилметиламина дигидрохлорид (VI)** получали по способу [27]. Выход 20%. Т. пл. 277–279°С (т. пл. 290–292°С [27]). УФ-спектр, λ<sub>max</sub>, нм (ε): 242 (54500); 276 (37500); 342 (36500).

**Синтез пиреновых производных декануклеотидов (Iб; Iб, г; IIIб, в, г).** Растворяли 0.15 мкмоль цетавлоновой соли декануклеотида, содержащего концевую 3'- или 5'-концевую фосфатную группу, в 40 мкл DMSO и добавляли 1.7 мг 2,2'-дипиридилдисульфида и 2.0 мг (7.6 мкмоль) трифенилфосфина. Через 10 мин в смесь добавляли 1 мг (4.5 мкмоль) 4-N,N-диметиламинопиридина, выдерживали 10 мин и осаждали олигонуклеотидные производные добавлением 15-кратного избытка серного эфира. Осадок дважды промывали эфиром и растворяли в 50 мкл DMSO, содержащего 5 мкмоль соответствующего пиренового соединения. Смесь выдерживали 1 ч и осаждали олигонуклеотидный материал 15-кратным избытком 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок растворяли в 70 мкл воды и пересаждали 2% раствором LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Продукты выделяли методом ВЭЖХ (хроматографическая подвижность и спектрально-люминесцентные характеристики показаны в табл. 1). Выходы продуктов составляли 60–80%. Значение коэффициента молярного поглощения (ε<sub>260</sub>) олигонуклеотидов (Iа)–(IIIа) рассчитывали по методу [28].

**Определение ε<sub>max</sub> олигонуклеотидных производных (Iб, Iб, г, д; IIIб, в, г, д).** Раствор 120–150 ОЕ олигонуклеотидного производного сенсibilизатора или фотореагента в 150 мкл воды в тщательно взвешенной пробирке осаждали 2 мл 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, дважды промывали по 1 мл ацетона, центрифугировали, супернатант декантировали и осадок сушили в вакууме до постоянного веса. Пробирку с осадком взвешивали, осадок растворяли в 6 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7.6), содержащем 0.2 М NaCl и 0.02 мМ EDTA, и спектрофотометрировали.

**Флуоресцентные свойства.** Спектры флуоресценции пиренилметиламина, олигонуклеотидных производных и гашение их флуоресценции при образовании дуплексов записывали в буфере 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7.6), 0.2 М NaCl и 0.02 мМ EDTA. Длина волны возбуждения λ<sub>ex</sub> = λ<sub>max</sub> ± 5 нм, длина волны эмиссии λ<sub>em</sub> = 376 ± 5 нм.

**Фотомодификация ДНК-мишени.** Аликвоты по 5 мкл реакционной смеси, содержащей 100 нМ раствор ДНК-мишени М и 50 мкМ растворы олигонуклеотидных производных реагента и сенсibilизатора, помещали в цилиндрические лунки иммунологических планшетов диаметром 4 мм, закрывали крышками, охлаждали до 4°С и облучали светом ртутной лампы ДРК-120 осветителя

КФ-4М (ЛОМО, Санкт-Петербург) через следующие наборы стеклянных светофильтров ( $\lambda$ , нм;  $W$ , мВт · см<sup>-2</sup>): ЖС-3, УФС-2 (300–315; 0.1); БС-6, УФС-6 (330–365; 0.3); БС-7, УФС-5 (365–390; 0.15); ЖС-10, ПС-13 (400–415; 0.1); ЖС-11, СС-15 (415–455; 0.15); БС-8, СЗС-20 (400–480; 0.3). Интенсивность падающего на образцы УФ-света определяли с помощью ферриоксалатного актинометра [29], видимого – с помощью люксметра Ю-117 [30].

Использованная буферная система: 6 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7.6), содержащий 0.2 М NaCl и 0.02 мМ EDTA. Уменьшение объема раствора образцов, связанное с испарением, не превышало 20%. После облучения образцы (2 мкл) смешивали с 5 мкл раствора 7 М мочевины, содержащего 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленицианола FF, и анализировали методом 20% ПААГ-электрофореза (0.05 М трис-борат, рН 7.4). Экспонирование геля на рентгеновской пленке РМ-В с усиливающим экраном проводили в течение 8–24 ч при –10°C.

Радиоавтографы гелей сканировали на лазерном денситометре 2222 Ultroskane-XL (LKB, Швеция).

Авторы благодарят Т.А. Приходько за разработку N-оксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты и Т.В. Абрамову за синтез олигонуклеотидов. Настоящая работа была поддержана Международным научным фондом (грант № RCU 300), малым грантом Министерства энергетики США (программа "Геном человека"), Международным грантом INSERM (№ 94-EO-08) и грантом РФФИ (№ 95-03-080706а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, 1994.
2. Perelroyzen M.P., Volovodskii A.V. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 4693–4699.
3. Helene C., Toulme J.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1049. P. 99–110.
4. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1653–1660.
5. Korshun V.A., Pestov N.B., Birikh K.R., Berlin Yu.A. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 559–562.
6. Pyshnyi D., Pyshnaja I., Sergeev D., Vorobjev P., Lokhov S., Ivanova E., Zarytova V. // Nucleosides Nucleotides. 1995. V. 14. P. 1065–1068.
7. Koshkin A.A., Kropachev K.Yu., Mamaev S.V., Bulychev N.V., Lokhov S.G., Vlassov V.V., Lebedev A.V. // J. Mol. Recog. 1994. V. 7. P. 177–188.
8. Vlassov V.V. // The Lock- and Key Principle // Ed. J.-P. Behr. New York; London; Sydney: Wiley, 1994. P. 89–147.
9. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Докл. РАН. 1995. Т. 344. С. 122–125.
10. Vlassov V.V., Dobrikov M.I., Gaidamakov S.A., Gaidamakova E.K., Gainutdinov T.I., Koshkin A.A. // DNA and RNA Cleavers and Chemotherapy of Cancer and Viral Diseases / Ed. D. Meunier. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1996. P. 195–210.
11. Gaidamakova E.K., Karginov V.A., Kovalenko S.P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 198. P. 862–868.
12. Абрамова Т.В., Комарова Н.И., Мундус Д.А., Перембоева О.С. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1990. № 5. С. 45–51.
13. Кошкин А.А., Иванова Т.М., Булычев Н.В., Добриков М.И., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 570–582.
14. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1246–1252.
15. Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.А., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.
16. 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.
17. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Халимская Л.М. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 21–29.
18. 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.
19. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Левина А.С., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 200–207.
20. Мельников М.Я., Смирнов В.А. Фотохимия органических радикалов. М.: Изд-во МГУ, 1994. С. 90–128.
21. Leyshon L.J., Reiser A. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2. 1972. P. 1918–1927.
22. Shields C.J., Farley D.E., Schuster G.B., Buchardt O., Nielsen P.E. // J. Org. Chem. 1988. V. 53. P. 3501–3507.
23. Mann J.S., Shibata Y., Meehan T. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 554–558.
24. Kierzek R., Li Y., Turner D.H., Bevilacqua P.C. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 4985–4992.
25. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. Т. 3.: Пер. с англ. М.: Мир, 1970. С. 296.
26. Kenneth W.B., Tuttle R.L., Knick V.C., Cory M., McKee D.D. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 2385–2393.



27. Marcus E., Fitzpatrick J.T. // *J. Org. Chem.* 1960. V. 25. P. 199–202.
28. Cantor C.R., Tinoco J. // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. P. 65–77.
29. Калверт Дж., Питтс Дж. Фотохимия: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 635.
30. Соколов М.В. Прикладная биофотометрия. М.: Наука, 1982. С. 79–116.

## Sensitized Photomodification of DNA by Binary Systems. I. Synthesis of Oligonucleotide Reagents and the Effect of their Structure on the Efficacy of Target Modification

M. I. Dobrikov\*, S. A. Gaidamakov\*\*, A. A. Koshkin\*, T. I. Gainutdinov\*,  
N. P. Luk'yanchuk\*, G. V. Shishkin\*, and V. V. Vlasov\*

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

\*\* *Institute of Molecular Pathology and Ecological Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russia*

**Abstract**—A highly effective sensitized photomodification of the target DNA by a binary system of oligonucleotide reagents complementary to adjacent regions of the target was accomplished. One of the oligonucleotides carries a photoreagent *p*-azidotetrafluorobenzamide, and the other carries a pyrene sensitizer. Synthesis of the oligonucleotide derivatives was described. The rate and efficacy of the direct and sensitized target photomodifications depending on the location of the photoreagent and sensitizer at the 3'- and 5'-terminal phosphates and on the length of the linker between the sensitizer and addressed nucleotide were studied. The oligonucleotide derivatives with the photoreagent at the 3' terminus proved to be more effective (yield of the covalent adducts 70%). The rate of photomodification sensitized by UV light (365–390 nm) is 100–1500-fold higher than that of the direct site-specific modification and decreases with an increasing length of the linker. In all cases, modification occurs at the guanosine residue located near the photoreagent.

**Key words:** *perfluoroarylazides, oligonucleotide derivatives, sensitized DNA photomodification, energy transfer.*