



УДК 547.963.3:577.113.6

СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК БИНАРНЫМИ СИСТЕМАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЪЮГАТОВ. III. ДВУХКВАНТОВАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ

© 1998 г. М. И. Добриков[#], С. А. Гайдамаков*, Г. В. Шишкин, В. В. ВласовНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

* Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН, Новосибирск

Поступила в редакцию 14.01.98 г. Принята к печати 15.06.98 г.

Изучена сайт-специфическая фотомодификация одноцепочечной ДНК олигонуклеотидным производным *n*-азидо-*O*-(4-аминобутил)тетрафторбензальдоксима, сенсibilизированная олигонуклеотидным производным пиренил-1-метиламина. При облучении длинноволновым УФ-светом (365–390 нм) комплементарного комплекса ДНК-мишени с олигонуклеотидными реагентами за счет синглет-синглетного переноса энергии с сенсibilизатора на фотореагент наблюдается значительное увеличение скорости сенсibilизированной фотомодификации по остатку G¹¹ ДНК-мишени по сравнению с прямой фотомодификацией. При одновременном облучении комплекса УФ- и видимым светом в области триплет-триплетного поглощения пирена (365–580 нм) происходит дополнительное увеличение скорости модификации и изменение ее позиционной направленности (с остатка G¹¹ на остаток T¹³) за счет двухквантовой триплет-триплетной сенсibilизации. Суммарная степень сенсibilизированной фотомодификации достигает 80%.

Ключевые слова: олигонуклеотиды антисмысловые; азиды перфторароматические; сенсibilизация двухквантовая; перенос энергии; ДНК; фотомодификация.

Направленная модификация реакционноспособными производными олигонуклеотидов широко применяется для изучения структуры и функций нуклеиновых кислот и для ингибирования экспрессии конкретных генов [2]. Для увеличения специфичности воздействия на определенные последовательности ДНК нами были предложены бинарные системы олигонуклеотидных конъюгатов [1, 3–6]. Конъюгаты содержат остатки сенсibilизатора и фотореагента, между которыми при сближении в комплементарном комплексе может осуществляться перенос энергии электронного возбуждения. Было показано, что сенсibilизированная за счет такого переноса энергии фотомодификация ДНК-мишени протекает значительно быстрее, более эффективно и специфично, чем прямая фотомодификация в отсутствие сенсibilизатора [4, 5].

При одновременном облучении УФ- и видимым светом в диапазоне 365–580 нм было обнаружено дополнительное шестикратное увеличение скорости сенсibilизированной фотомодифика-

ции ДНК-мишени бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов, несущих остатки пирена и *n*-азидотетрафторбензамида, и изменение ее позиционной направленности с остатка гуанозина на остаток тимидина [1]. На основании этого было сделано предположение о возможности двухквантовой триплет-триплетной сенсibilизации фотореагента в этих условиях.

Двухквантовая сенсibilизация обладает рядом преимуществ в плане создания эффективных подходов к направленному воздействию на нуклеиновые кислоты *in vivo*. Возбуждение реагентов двумя квантами длинноволнового света позволяет значительно увеличить специфичность сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени за счет уменьшения доли побочных одноквантовых реакций, а обнаруженное изменение позиционной направленности фотомодификации при двухквантовой сенсibilизации по сравнению с одноквантовой [1] может быть полезным при изучении сложных биологических комплексов.

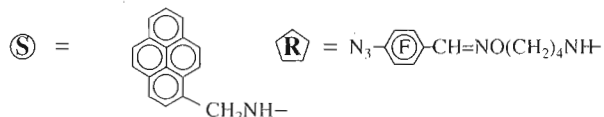
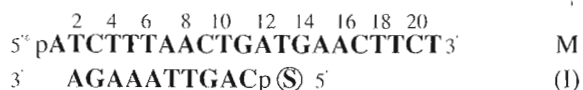
Преимущества двухквантовых реакций были отмечены при изучении иницированных УФ-светом (248–290 нм) высокой интенсивности шивок РНК с белками в рибосомах [7], ДНК с гистонами в хроматине [8], при прямом двухквантовом расщеплении одноцепочечной и двухцепочечной ДНК [9, 10], при возбуждении сенсibilизи-

Сообщение II см. [1].

Префикс "d" в обозначениях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки.

Олигонуклеотиды и их производные:



Изученные комплексы:

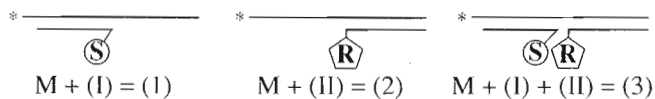
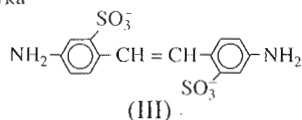
* - ³²P-метка

Схема.

заторов для фотодинамической терапии [11] и при комплементарно-адресованном двухквантовом фоторасщеплении одноцепочечной ДНК дансильными [12] и этидиевыми [13, 14] производными олигонуклеотидов.

Данная работа посвящена изучению направленной сенсibilизированной фотомодификации ДНК бинарной системой олигонуклеотидных реагентов в условиях протекания синглет-синглетного и двухквантового триплет-триплетного переноса энергии.

В качестве мишени использовался одноцепочечный олигонуклеотид (М). Бинарная система состояла из олигонуклеотидных производных, несущих остатки сенсibilизатора – пиренил-

1-метиламина (S) и фотореагента – *n*-азидо-*O*-(4-аминобутил)тетрафторбензальдоксима (RH). ДНК-мишень, олигонуклеотиды, образуемые ими комплексы и структуры сенсibilизатора и фотореагента представлены на схеме.

Строение олигонуклеотидных реагентов (длина олигонуклеотидов-адресов, расположение сенсibilизатора на 5'-концевом фосфате производного (I), фотореагента на 3'-концевом фосфате производного (II), а также длина линкера между сенсibilизатором и олигонуклеотидом-адресом) были оптимизированы ранее [6]. Фотореагент (RH) был выбран для изучения влияния строения перфторарилазидов в сравнении с *n*-азидотетрафторбензамидом [1] на протекание сенсibilизированной фотомодификации.

Синтез и свойства олигонуклеотидного производного (I) описаны в работе [6], а фотореагента (RH) – в работе [15]. Олигонуклеотидное производное (II) было получено описанным ранее методом [6].

Согласно данным [16], доказательствами переноса энергии с возбужденных (путем последовательного поглощения двух квантов света триплетных уровней) фотосенсibilизаторов на органические соединения являются: участие нижнего триплетного состояния в сенсibilизации триплетных реакций, квадратичная зависимость начальной скорости фотореакции от интенсивности возбуждающего света и опыты с одновременным возбуждением светом двух разных длин волн.

На рис. 1 представлена диаграмма уровней возбужденных электронных состояний сенсibilизатора и фотореагента, подробно рассмотренная нами в предыдущем сообщении [1]. В случае синглетной сенсibilизации после поглощения кванта УФ-света ($h\nu_1$) молекула сенсibilизатора возбуждается в S_1 -состояние, из которого термодинамически разрешен синглет-синглетный перенос энергии на S_1 -уровень фотореагента. Далее в темновой стадии возбужденный фотореагент диссоциирует на азот и синглетный нитрен, который способен реагировать с ДНК-мишенью, образуя стабильные аддукты, характерные для этой электрофильной частицы.

Известно, что пирен обладает достаточно высоким квантовым выходом интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ($\Phi_{ISC} = 0.37$ [17]), но энергия триплетного уровня пирена ($E(T_1)$ 48.7 ккал/моль [18]) намного ниже, чем энергия триплетного уровня ароматического азидо ($E(T_1) \approx 68$ ккал/моль [19]). Следовательно, одноквантовая триплетная сенсibilизация азидо RH пиреном невозможна.

В то же время пирен обладает интенсивным триплет-триплетным поглощением в видимой области (рис. 2). Время жизни триплетного состояния достаточно велико и пирен, находясь в этом

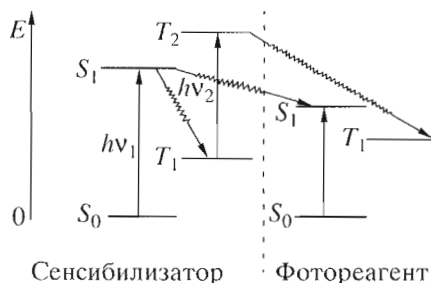


Рис. 1. Диаграмма Яблонского для графического отображения основных и возбужденных электронных состояний сенсibilизатора и фотореагента.

состоянии, способен поглотить второй квант, в данном случае видимого света ($h\nu_2$), и перейти на более высокие триплетные уровни (рис. 1) [1]. Энергия возбужденного триплетного уровня пирена ($E(T_2)$ 77.8 ккал/моль [18]), намного больше, чем энергия триплетного уровня арилазида. Вследствие этого двухквантовый триплет-триплетный перенос энергии с сенсibilизатора на T_1 -уровень фотореагента термодинамически разрешен и должен протекать с диффузионно-контролируемой скоростью. Далее возбужденный за счет триплет-триплетного переноса энергии азид (R^*) диссоциирует на азот и триплетный нитрен, который образует продукты модификации с ДНК-мишенью, характерные для этой бирадикальной частицы.

Для выявления возможности двухквантовой триплетной сенсibilизации по описанной выше схеме необходимо было показать способность пиренил-1-метиламина сенсibilизировать триплетные реакции. С этой целью в кислородных и бескислородных условиях были изучены прямая и сенсibilизированная пиренил-1-метиламином E/Z -фотоизомеризации водорастворимого производного стильбена (III), которое находится преимущественно в виде E -изомера. За ходом фотоизомеризации можно следить по уменьшению поглощения этого изомера (λ_{\max} 285 нм). E/Z -фотоизомеризация стильбенов протекает прямо под действием света через синглетное возбужденное состояние или при помощи триплетных сенсibilизаторов соответственно через триплетное состояние [20].

Как видно из рис. 3, начальная скорость прямой E/Z -фотоизомеризации не зависит от наличия кислорода (кривые 1, 2), что согласуется с общепринятым механизмом этой реакции. В присутствии сенсibilизатора начальная скорость E/Z -фотоизомеризации в кислородных условиях возрастает в 3 раза (кривая 3), а в отсутствие кислорода – в 4 раза (кривая 4) по сравнению с прямой фотоизомеризацией (кривые 1 и 2 соответственно). Увеличение скорости сенсibilизированной E/Z -фотоизомеризации не может происходить за счет синглет-синглетного переноса энергии с пирена на стильбен, поскольку E_s стильбена (82 ккал/моль) больше чем E_s пирена (76 ккал/моль) [20].

Доказательством того, что наблюдаемая реакция может протекать только за счет триплетной сенсibilизации, является увеличение начальной скорости сенсibilизированной E/Z -фотоизомеризации в бескислородных условиях (кривые 2 и 4). Кислород, находясь в основном триплетном состоянии, эффективно тушит возбужденные триплетные состояния сенсibilизатора.

Из полученных данных следует, что пиренил-метиламин является эффективным триплетным

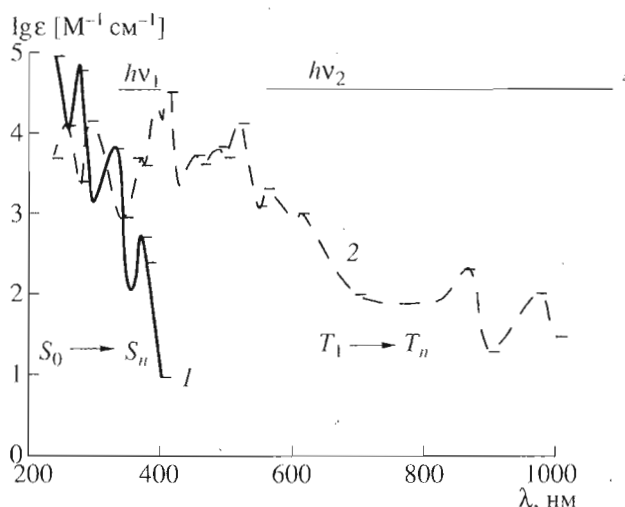


Рис. 2. Спектры синглет-синглетного (1) и триплет-триплетного (2) поглощения пирена [18]. $h\nu_1$ и $h\nu_2$ – диапазоны иницирования фотомодификации.

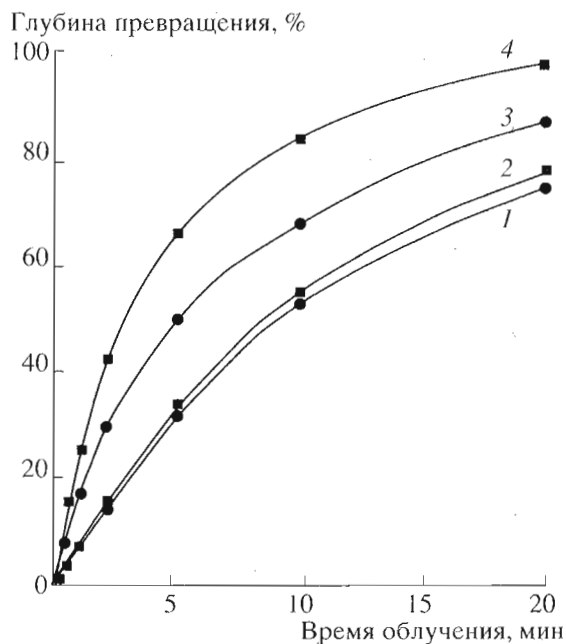


Рис. 3. Прямая (1, 2) и сенсibilизированная пиренил-метиламином (3, 4) E/Z -изомеризация 4,4'-диаминостильбена-2,2'-дисульфокислоты в кислородных (1, 3) и бескислородных (2, 4) условиях.

сенсibilизатором, так как даже в кислородных условиях скорость сенсibilизированной E/Z -фотоизомеризации стильбена (III) больше, чем прямой.

При интеркаляции в ДНК бромистого этидия и других красителей наблюдается увеличение квантового выхода их интеркомбинационной конверсии в триплетное T_1 -состояние в 3–4 раза [21]. Кроме того, интеркаляция в ДНК полициклических ароматических углеводородов [22] и

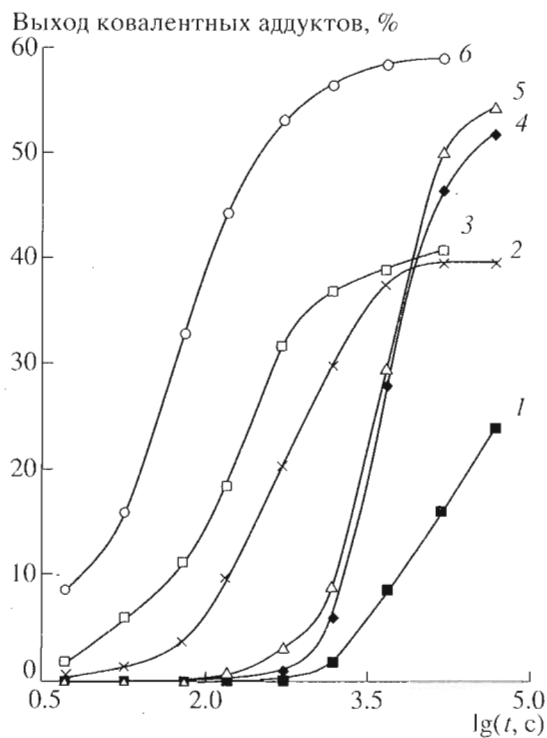


Рис. 4. Выход ковалентных аддуктов (%) при проведении прямой и сенсibilизированной фотомодификации в зависимости от времени облучения: прямая фотомодификация в дуплексе (2) при облучении в диапазоне длин волн, нм: 400–580 (1), 365–390 (4), 365–580 (5); сенсibilизированная фотомодификация в комплексе (3) при облучении светом в диапазоне, нм: 400–580 (2), 365–390 (3), 365–580 (6).

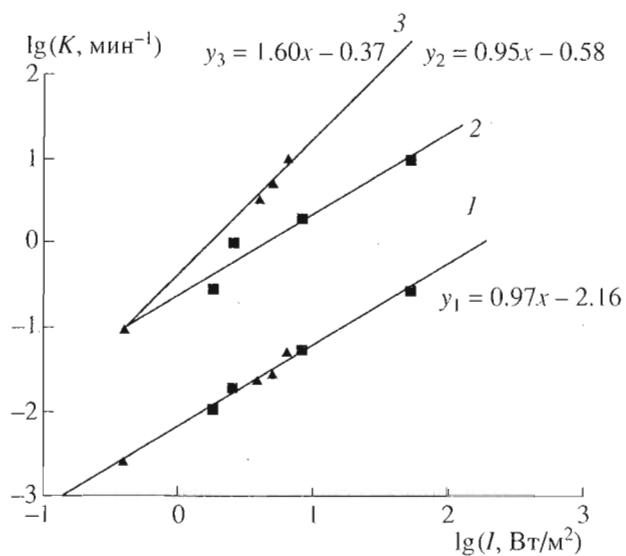


Рис. 5. Зависимость константы начальной скорости (K) прямой (1) и сенсibilизированной (2, 3) фотомодификации ДНК-мишени от потока мощности активного для фотореагента излучения: ■ – 365–390 нм, ▲ – 365–440 нм.

фурукумаринов [23] приводит к увеличению времени жизни триплетных возбужденных состояний интеркаляторов и к снижению констант тушения их кислородом в 10–20 раз. Следовательно, в комплементарном комплексе триплетно-сенсibilизированные фотореакции могут протекать намного эффективнее, чем в растворе.

На рис. 4 приведены данные по накоплению ковалентных сшивок при прямой и сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени, инициированных облучением в разных спектральных диапазонах: УФ-светом (365–390 нм); видимым светом (400–580 нм) и одновременно УФ- и видимым светом (365–580 нм).

Облучение видимым светом вызывает медленное протекание прямой фотомодификации (кривая 1), за счет слабого $n\pi^*$ -поглощения фотореагента в области 430 нм. В этих условиях начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации (кривая 2) примерно в 100 раз больше. Следует отметить, что при облучении более длинноволновым светом (470–580 нм) не наблюдается ни прямой, ни сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени (данные не представлены).

При облучении УФ-светом начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации (кривая 3) больше скорости прямой фотореакции (кривая 4) примерно в 150 раз. Одновременное облучение УФ- и видимым светом вызывает лишь незначительное увеличение начальной скорости и предельной степени прямой фотомодификации (кривая 5), по сравнению с облучением только УФ-светом (кривая 4), но вызывает пятикратное увеличение начальной скорости и предельной степени сенсibilизированной фотомодификации с 40 до 60% (кривые 3 и 6 соответственно).

Эти данные согласуются с ранее полученными результатами по прямой и сенсibilизированной производным пирена фотомодификации ДНК-мишени *n*-азидотетрафторбензамидным производным олигонуклеотида [1]. Увеличение скорости и степени модификации ДНК-мишени при дополнительном облучении в области триплет-триплетного поглощения сенсibilизатора может происходить за счет вклада двухквантовой триплетной сенсibilизации. В этом случае должна наблюдаться нелинейная зависимость скорости фотореакции от потока мощности излучения [16, 24].

На рис. 5 в логарифмических координатах приведены зависимости начальных скоростей накопления ковалентных аддуктов в комплексах (2) и (3) от потока мощности излучения при облучении в различных диапазонах длин волн. В этих координатах тангенс угла наклона прямой соответствует порядку реакции по свету [24]. Видно, что

при всех условиях облучения тангенс угла наклона для прямой фотомодификации близок к единице (прямая 1). Тангенс угла наклона для сенсibilизированной фотомодификации при облучении УФ-светом (365–390 нм) также близок к единице (прямая 2), в то время как при одновременном облучении УФ- и видимым светом (365–580 нм) равен 1.6 (прямая 3). Это доказывает, что в таких условиях облучения помимо одноквантовых процессов протекает и двухквантовый.

Из полученных данных следует, что облучение в области триплет-триплетного поглощения сенсibilизатора, и выбор сенсibilизатора, обладающего большим временем жизни T_1 -состояния (~ 1 с [1]), позволяет регистрировать двухквантовые процессы при потоках мощности актиничного облучения 1–10 Вт/м². Это значительно меньше, чем необходимо для инициации прямого двухквантового возбуждения ДНК ($>10^9$ Вт/м²) [7–10, 25]. Однако представленные данные приближаются к результатам по направленной двухквантовой фотомодификации и фоторасщеплению одноцепочечной ДНК дансильными [12] и этидиевыми [13, 14] производными олигонуклеотидов. При облучении азотным лазером (337 нм, поток мощности $\geq 10^2$ Вт/м²) происходило ступенчатое двухквантовое возбуждение интеркалированного в ДНК хромофора с последующим безызлучательным переносом энергии на мишень. Энергии двух квантов было достаточно для инициирования различных видов фотомодификации, включая разрывы фосфодиэфирных связей [13]. Для эффективности расщепления ДНК-мишени наблюдалась квадратичная зависимость от плотности мощности облучения. Суммарная степень модификации ДНК-мишени возрастала и достигала 90%, что показывает перспективность использования двухквантовых процессов для проведения реакций в комплексах [13].

При фотомодификации ДНК (М) олигонуклеотидным производным *n*-азидотетрафторбензамида, сенсibilизированной олигонуклеотидным производным (I), наблюдалось изменение позиционной направленности фотомодификации с остатка G¹¹ на остаток T¹³ при изменении условий облучения [1].

Мы исследовали состав продуктов фотомодификации мишени М в комплексах (1), (2) и (3), инициированной облучением в различных диапазонах длин волн, после пиперидинового расщепления (рис. 6). Видно, что при облучении узким спектром, когда возможно только одноквантовое возбуждение, и прямая и сенсibilизированная фотореакции (дорожки 2, 3, 4 соответственно) протекают высокоспецифично по одному остатку G¹¹. При облучении широким спектром в обоих случаях (дорожки 7, 8) преимущественная мо-

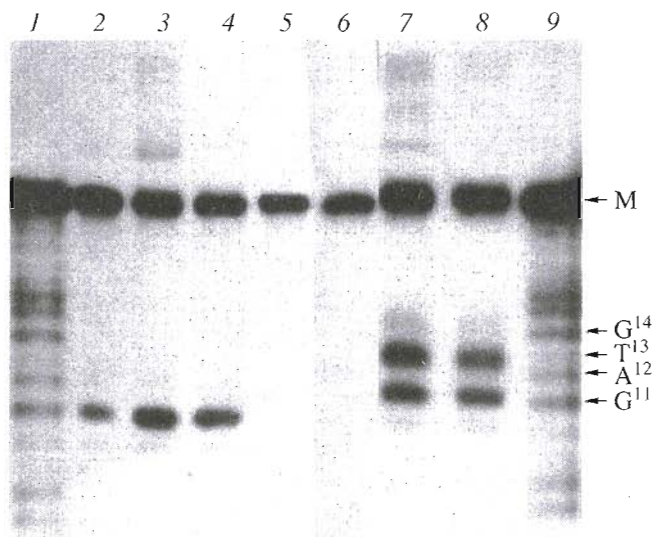


Рис. 6. Радиоавтографы продуктов прямой (2, 4, 8) в комплексе (2), (5, 6) в комплексе (1) и сенсibilизированной (3, 7) в комплексе (3) фотомодификации 5'-³²P-меченой ДНК-мишени после пиперидинового расщепления в зависимости от условий облучения: 1, 9 – А+G-специфичное расщепление ДНК-мишени; 2, 3 – λ 405 нм, τ 100 мин; 4, 5 – λ 405 нм, τ 300 мин; 6, 7, 8 – λ 365–580 нм, τ 100 мин.

дификация происходит по остаткам G¹¹ и T¹³ и наблюдается минорная модификация по остаткам G¹⁴ и T¹⁰. Фотомодификации в дуплексе (1) в отсутствие реагента не наблюдается (дорожки 5, 6).

В отличие от этого при облучении широким спектром прямая модификация *n*-азидотетрафторбензамидным производным ранее наблюдалась только по остатку G¹¹, а сенсibilизированная преимущественно по остатку T¹³ [1]. Для более точного сопоставления свойств фотореагентов данные по фотомодификации после пиперидинового расщепления были просканированы и обчислены как в работе [1] (таблица).

Общая степень сенсibilизированной фотомодификации во всех условиях облучения заметно выше, чем прямой, и достигает 80% при облучении широким спектром. При облучении видимым светом (400–580 нм) прямая и сенсibilизированная фотомодификации протекают только по остатку G¹¹. При облучении УФ-светом (365–390 нм) или одновременно УФ- и видимым светом наблюдается модификация по остаткам и T¹⁰, G¹¹, T¹³ и G¹⁴.

Следует отметить, что в случае прямой фотомодификации при переходе от УФ-облучения к облучению в более широком диапазоне (365–580 нм), т.е. от условий одноквантового поглощения к условиям двухквантового, роста модификации по остатку T¹³ не происходит, в то время как при сенсibilизированной модификации наблюдается заметный рост модификации по этому остатку. Эти

Усредненные по 2–3 экспериментам данные по пиперидиновому расщеплению $5'$ - ^{32}P -меченой мишени после облучения в течение 1.5 ч

Фотомодификация	λ обл., нм	Немодифицированная мишень, %	Общая степень модификации, %	Нерасщепившиеся аддукты, %	Расщепление по остаткам, %			
					T ¹⁰	G ¹¹	T ¹³	G ¹⁴
Прямая, дуплекс (2)	365–390	52	48	8	6	20	11	3
	400–580	81	19	0	0	19	0	0
Сенсибилизированная, комплекс (3)	365–580	46	54	7	7	24	10	6
	365–390	47	53	13	3	20	14	3
	400–580	58	42	2	0	40	0	0
	365–580	20	80	8	0	40	30	8

данные согласуются с предполагаемым механизмом двухквантовой триплетной сенсибилизации при облучении в диапазоне 365–580 нм.

Сравнивая используемый в данной работе фотореагент РН с *n*-азидотетрафторбензамидом [1], можно сделать вывод, что накопление в случае прямой и сенсибилизированной фотомодификации ковалентных аддуктов и продуктов их пиперидинового расщепления (таблица) происходит быстрее. Это подтверждает ранее полученные данные о более высокой фотоактивности эксимера РН [15] и о более эффективном переносе энергии электронного возбуждения с остатка пирена на остаток R фотореагента.

Таким образом, подтверждена возможность протекания двухквантовой триплетной сенсибилизации фотомодификации при низких потоках мощности излучения 1–10 Вт/см², что позволяет использовать для ее инициации источники света низкой пиковой мощности – лампы постоянного действия. При таких мощностях облучения исключается нагревание образцов и связанные с этим конформационные изменения биополимеров. Это может оказаться полезным при изучении функционирования сложных биологических комплексов и при разработке подходов к воздействию на биополимеры в составе живых организмов.

В обзоре [16] проанализированы работы по двухквантовой триплет-триплетной сенсибилизации. В некоторых случаях было оценено критическое расстояние, на которое осуществляется двухквантовый триплет-триплетный перенос энергии. Оно оказалось равным 0.5–0.6 нм, что в 2–3 раза меньше, чем для одноквантового триплет-триплетного переноса, и в 4–10 раз меньше, чем для синглет-синглетного переноса энергии. Наличие двухквантовой сенсибилизации в комплексном комплексе (3) позволяет предположить, что остатки сенсибилизатора и фотореагента имеют возможность сближаться на расстояние до 0.6 нм.

Полученные в работе результаты открывают новые возможности для конструирования эффективных бинарных систем реагентов, пригодных для фотомодификации ДНК и других биополимеров *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовалась 4,4'-диаминостильбен-2,2'-дисульфокислота (ч.д.а., Реахим). Синтез и свойства олигонуклеотидного производного (I) описаны ранее [6]. Олигонуклеотидное производное (II) получено методом [6]. Выход продукта (II) 65%. УФ-спектр в воде, $\lambda_{\text{макс}}$ 269 нм. Коэффициент молярного поглощения (ϵ_{260} 120000 М⁻¹ см⁻¹) принимали равным сумме значений для исходного олигонуклеотида (ϵ_{260} 104000 М⁻¹ см⁻¹ [6]) и фотореагента (ϵ_{260} 16000 М⁻¹ см⁻¹). В УФ-спектре производного (II) наблюдается плечо в области 290 нм, соответствующее поглощению фотореагента. Для исходного олигонуклеотида отношение $\epsilon_{260}/\epsilon_{290}$ 10.6, а для производного (II) – 3.8, что соответствует стехиометрическому соотношению олигонуклеотид–фотореагент 1:1.

Сенсибилизированная E/Z-изомеризация 4,4'-диаминостильбен-2,2'-дисульфокислоты (III). Растворы стильбена (III) (0.1 мМ) в 50% водном этаноле в кварцевой кювете с притертой пробкой в присутствии и в отсутствие пиренил-1-метил-амин (0.05 мМ) облучали 0–90 мин светом в диапазоне 365–580 нм. Для проведения реакции в бескислородных условиях раствор предварительно 25 мин барботировали аргоном. За протеканием E/Z-фотоизомеризации следили по уменьшению поглощения E-изомера стильбена (III) на длине волны 285 нм до прекращения изменений. Фотохимические свойства реагентов изучали, облучая их растворы конденсированным светом ртутной лампы высокого давления ДРК-120 осветителя ОИ-18А (ЛОМО, Россия), фильтрованным следующими наборами светофильтров (λ , нм; W, мВт/см²): БС-7, СС-2 (365–580; 11.5).

Фотомодификация ДНК-мишени (М). Реакционные смеси (5 мкл), содержащие 100 нМ ДНК-мишень и 50 мкМ олигонуклеотидные производные реагента и сенсibilизатора в буферной системе (6 мМ Na₂HPO₄ (рН 7.6), 0.2 М NaCl и 0.02 мМ EDTA), помещали в цилиндрические лунки диаметром 4 мм иммунологических планшетов, закрывали крышками и облучали светом ртутной лампы ДРК-120 осветителя КФ-4М (ЛОМО, Санкт-Петербург) через следующие наборы стеклянных светофильтров (λ , нм; W , мВт/см²): БС-7, УФС-5 (365–390; 0.15); ЖС-10, СС-2 (400–580; 0.95); БС-7, СС-2 (365–580; 1.1); БС-7, СС-15 (365–440; 0.35); ЖС-10, ПС-13 (405; 0.1) или конденсированным светом ртутной лампы высокого давления ДРК-120 осветителя ОИ-18А (ЛОМО, Россия), фильтрованным следующими наборами светофильтров (λ , нм; W , мВт/см²): БС-7, УФС-1 (365–390; 2), БС-7, СС-2 (365–580; 11.5). Интенсивность падающего на образцы УФ-света определяли с помощью ферриоксалатного актинометра [26], видимого – с помощью люксметра Ю-117 [27]. 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% ксиленцианола 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 Ultroskanе-XL (ЛКВ, Швеция).

Настоящая работа была поддержана грантом РФФИ № 95-03-080706а и грантом СО РАН по ген-иммунизации и генотерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 553–560.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and targeted reactions of oligonucleotide derivatives. CRC Press, Boca Raton, 1994.
3. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Докл. РАН. 1995. Т. 344. С. 122–125.
4. 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. V. Meunier: NATO ASI Series; Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., The Netherlands, 1996. P. 195–210.
5. Dobrikov M.I., Gaidamakov S.A., Gaidamakova E.K., Gainutdinov T.I., Koshkin A.A., Vlassov V.V. // Anti-sense Nucl. Acid Drug Develop. 1997. V. 7. P. 309–317.
6. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 191–199.
7. Budowsky E.I., Axentieva M.S., Abdurashidova G.G., Simukova N.A., Rubin L.B. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 159. P. 95–101.
8. Angelov D.A., Stefanovsky V.Yu., Dimitrov S.I., Rusanova V.R., Keskinova I., Pashev I.G. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 4525–4538.
9. Masnuk T.W., Minton K.W. // Photochem. Photobiol. 1991. V. 54. P. 99–107.
10. Bothe E., Gorner H., Opits J., Schulte-Frohlinde D., Siddiqi A., Wala M. // Photochem. Photobiol. 1990. V. 52. P. 949–959.
11. Fisher W.G., Partridge W.P., Jr., Dees C., Wachter E.A. // Photochem. Photobiol. 1997. V. 66. P. 141–155.
12. Benimetskaya L.Z., Bulychev N.V., Kozionov A.L., Lebedev A.V., Nesterikhin Yu.E., Novozhilov S.Yu., Rautian S.G., Stockmann M.I. // FEBS Lett. 1983. V. 163. P. 144–149.
13. Бенимецкая Л.З., Булычев Н.В., Козионов А.Л., Кошкин А.А., Лебедев А.А., Новозhilов С.Ю., Штокман М.И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 48–57.
14. Benimetskaya L.Z., Bulychev N.V., Kozionov A.L., Lebedev A.V., Novozhilov S.Yu., Stockmann M.I. // Biopolymers. 1989. V. 28. P. 1129–1147.
15. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 191–199.
16. Ермолаев В.Л., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б., Шахвердов Т.А. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. Л.: Наука, 1977. С. 94–163.
17. Wilkinson F. // Organic Molecular Photophysics, V. 2 / Eds J.B. Birks. J. London; New York; Toronto; Sydney: Wiley, 1975. P. 95–158.
18. Labhart H., Heinzermann W. // Organic Molecular Photophysics. V. 1 / Eds J.B. Birks. J. London; New York; Toronto; Sydney: Wiley, 1973. P. 297–355.
19. Leyshon L.J., Reiser A. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2. 1972. P. 1918–1927.
20. Ельцов А.В. Органические фотохромы. Л.: Химия, 1982. С. 120–188.
21. Atherton S.J., Beaumont P.C. // Photochem. Photobiol. 1993. V. 57. P. 460–464.
22. Geacintov N.E., Prusik T., Khosroffian J.M. // J. Am. Chem. Soc. 1976. V. 98. P. 6444–6447.
23. Ronfard-Haret J.V., Averbek D., Bensasson R.V., Bisagni E., Land E.J. // Photochem. Photobiol. 1982. V. 35. P. 479–486.
24. Эмануэль Н.М., Кузьмин М.Г. Экспериментальные методы химической кинетики. М.: МГУ, 1985. С. 225–276.
25. Kovalsky O.I., Budowsky E.I. // Photochem. Photobiol. 1990. V. 51. P. 659–665.
26. Калверт Дж., Питтс Дж. Фотохимия: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 635.
27. Соколов М.В. Прикладная биофотометрия. М.: Наука, 1982. С. 79–116.

Sensitized Photomodification of DNA by Binary Systems of Oligonucleotide Conjugates. III. Two-Photon Sensitization

M. I. Dobrikov*#, S. A. Gaidamakov**, G. V. Shishkin*, and V. V. Vlassov*

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

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

Site-specific modification of single-stranded DNA by oligonucleotide derivatives of *p*-azido-*O*-(4-aminobutyl)tetrafluorobenzaldoxime sensitized by an oligonucleotide derivative of pyrenylethylamine was studied. Upon irradiation with the long-wave UV light (365–390 nm) of a DNA target–oligonucleotide reagent complementary complex, a considerable increase in the rate of sensitized photomodification at the G11 residue of the target relative to the direct photomodification was observed owing to the singlet–singlet energy transfer from the sensitizer onto the photoreagent. Upon simultaneous irradiation of the complex with UV and visible light in the region of the triplet–triplet absorption of pyrene (360–580 nm), an additional increase in the modification rate and a change in its site-direction (from the G11 to T13 residue) occurred through the two-photon triplet–triplet sensitization. The total extent of the structure photomodification amounted to 80%.

Key words: antisense oligonucleotides; azides perfluoroaromatic; sensitization two-photon; energy transfer; DNA, photomodification

To whom correspondence should be addressed.