



УДК 547.963.3:577.113.6

СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК БИНАРНЫМИ СИСТЕМАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЪЮГАТОВ. IV*. ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА

© 1999 г. М. И. Добриков[#], С. А. Гайдамаков, Т. И. Гайнутдинов,
Е. Д. Тенетова, Г. В. Шишкин, В. В. Власов

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

Поступила в редакцию 14.01.98 г. Принята к печати 20.06.98 г.

Изучена сенсibilизированная к видимому свету (450–580 нм) фотомодификация одноцепочечной ДНК бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов, комплементарных соседним участкам ДНК. Один олигонуклеотид несет на 3'-концевом фосфате остаток фотореагента – *n*-азидотетрафторбензальгидразона, другой на 5'-концевом фосфате содержит остаток сенсibilизатора – перилена или 1,2-бензантрацена. Скорость сенсibilизированной олигонуклеотидным производным перилена фотомодификации в 300000 раз больше скорости фотомодификации в отсутствие сенсibilизатора. Поскольку энергия возбуждения перилена меньше, чем энергия, необходимая для инициации фоторазложения азида, вероятно, в комплементарном комплексе сенсibilизация осуществляется за счет переноса электрона с азидогруппы фотореагента на возбужденный сенсibilизатор. Сенсibilизация олигонуклеотидным производным 1,2-бензантрацена протекает за счет синглет-синглетного переноса энергии, что позволяет этому сенсibilизатору функционировать в роли нерасходуемого катализатора, каждая молекула которого способна инициировать фотомодификацию более 20 молекул ДНК.

При обоих механизмах сенсibilизации фотомодификация протекает высокоспецифично по остатку G¹¹ ДНК-мишени. Степень сенсibilизированной фотомодификации достигает 72%.

Ключевые слова: азиды перфторароматические; антисмысловые олигонуклеотиды; ДНК, фотомодификация.

Увеличение специфичности узнавания реакционноспособными олигонуклеотидными производными нуклеиновых кислот – мишеней в физиологических условиях является одной из основных проблем при конструировании ген-направленных биологически активных веществ [2]. Ранее для увеличения эффективности и специфичности направленной фотомодификации нуклеиновых кислот нами было предложено использование бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов, комплементарных соседним участкам мишени и несущих остатки фотореагентов и флуоресцентных сенсibilизаторов [1, 3–6]. Сближенные в составе комплементарного комплекса реагент и сенсibilизатор формируют фотореакционноспособный центр, активируемый длинноволновым УФ- [5] или фиолетовым [3, 4] светом за счет синглет-синглетного [3–5], или двухквантового триплет-триплетного [1, 6] переноса энергии.

Использование таких бинарных олигонуклеотидных систем позволяет увеличить скорость фотомодификации и в 90 раз повысить селективность по сравнению с несенсibilизированной фотореакцией [3, 4]. Увеличение селективности сенсibilизированной фотомодификации происходит за счет независимого связывания двух олигонуклеотидных конъюгатов с комплементарными последовательностями ДНК-мишени. Рост степени модификации объясняется тем, что в ходе реакции сенсibilизатор функционирует как нерасходуемый катализатор, каждая молекула которого способна инициировать фотомодификацию до 24 молекул ДНК-мишени [4].

Одним из перспективных путей применения бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов может быть избирательная модификация определенных видов нуклеиновых кислот в организме с терапевтическими целями. Для фотомодификации нуклеиновых кислот *in vivo* необходимо, чтобы реакция инициировалась видимым или ИК-светом, проникающим в клетки и не вызывающим

Префикс “d” в обозначениях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

* Сообщение III см. [1].

[#] Автор для переписки.

носителю спектра ранее описанного сенсibilизатора Sa-H [3, 4] на 60 нм.

Олигонуклеотидное производное перилена (1б) получено по методу, описанному в работе [5]. Конъюгат (1б) обладает следующим спектром поглощения: λ , нм, (ϵ , $M^{-1} cm^{-1}$): 256 (125000), 420 (29000), 448 (35000). При присоединении 3-аминометилперилена к олигонуклеотиду наблюдаются bathochromный сдвиг длинноволновой полосы поглощения на 9 нм и гашение флуоресценции на 20%.

Следует отметить, что спектр поглощения конъюгата (1б) сдвинут bathochromно относительно поглощения исходного перилена (λ_{max} 433 нм) на 13 нм, следовательно, энергия его возбужденного состояния ниже, чем энергия $E_{0,0}$ перилена на 2–3 ккал/моль. В свою очередь энергия возбуждения $E_{0,0}$ перилена ниже, чем энергия $E_{0,0}$ ароматических азидов. В связи с этим необходимо убедиться в принципиальной возможности сенсibilизировать фотодиссоциацию азида остатком перилена в составе конъюгата (1б). Возможность переноса энергии электронного возбуждения с сенсibilизатора (1б) на олигонуклеотидный реагент (2) показана методом гашения флуоресценции периленильного остатка при образовании комплементарных комплексов (рис. 1, кривые 3–5).

При связывании олигонуклеотидного производного 1,2-бензантрацена (1а) с комплементарной последовательностью М наблюдается 5-кратное гашение его флуоресценции (рис. 1, 1). Добавление к дуплексу (1а) второго олигонуклеотида (2), несущего остаток фотореагента, приводит к незначительному дальнейшему гашению флуоресценции (кривая 2). Эти данные подтверждают, что энергия возбуждения бензантраценильного остатка в основном переносится на гетероциклические основания ДНК и лишь в незначительной степени – на фотореагент.

В случае конъюгата (1б) наблюдается другая картина. При образовании дуплекса (1б) с ДНК-мишенью интенсивность флуоресценции гасится всего на 20% (кривая 3), добавление второго олигонуклеотида (4) без фотореагента практически не приводит к дальнейшему гашению флуоресценции сенсibilизатора (кривая 4). Добавление же к дуплексу (1б) олигонуклеотидного конъюгата (2) приводит к дополнительному трехкратному гашению флуоресценции (кривая 5), что свидетельствует об эффективном переносе энергии с остатка перилена на фотореагент в комплементарном комплексе (IVб).

Для изучения того, каким образом различная эффективность гашения флуоресценции остатков бензантрацена и перилена связана с модификацией нуклеиновых кислот была проведена прямая и

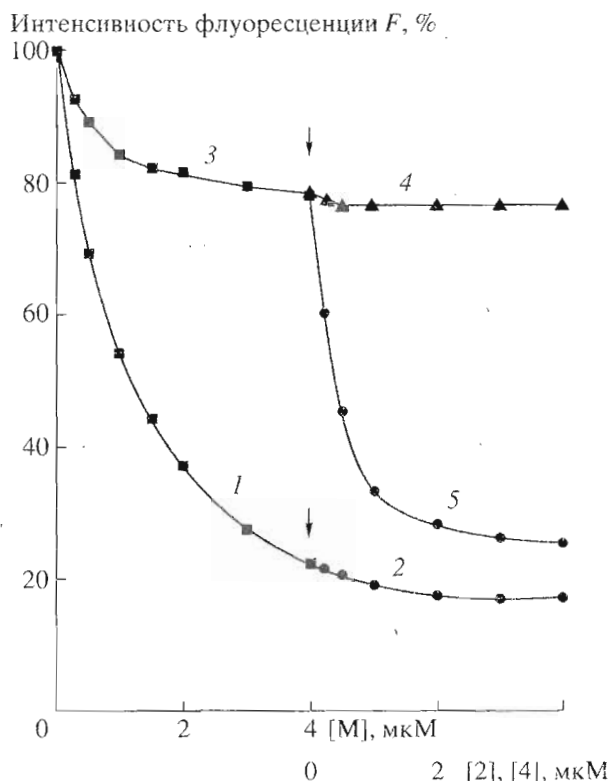


Рис. 1. Гашение флуоресценции олигонуклеотидных производных 1,2-бензантрацена (1а) (1–2) и перилена (1б) (3–5) при последовательном образовании комплексов (I), (II) и (IV). Концентрации конъюгатов (1а) – 1 и (1б) – 0,5 мкМ в 2 мМ Na_2HPO_4 , pH 7.1 с 200 мМ NaCl: 1–2 – $\lambda_{возб}$ 340 \pm 5 нм, $\lambda_{эм}$ 376 \pm 5 нм; 1 – образование дуплекса (1а), 2 – комплекса (IVа). 3–5 – $\lambda_{возб}$ 450 \pm 5 нм, $\lambda_{эм}$ 485 \pm 5 нм; 3 – образование дуплекса (1б), 4 – комплекса (IIб), 5 – комплекса (IVб). Стрелкой (\downarrow) отмечены места добавления в реакционную смесь с дуплексами (1а) или (1б) олигонуклеотидного конъюгата (2) или олигонуклеотида (4).

сенсibilизированная фотомодификация мишени М при облучении видимым светом (440–580 нм) в составе дуплексов (III) и (IVа, б) (рис. 2). Видно, что сенсibilизированная олигонуклеотидным производным перилена (1б) фотомодификация ДНК в комплексе (IVб) заканчивается после 1 мин облучения (дорожка 5) и выход ковалентных аддуктов шивки фотореагента с ДНК-мишенью достигает 70% и при дальнейшем облучении не меняется (дорожки 6 и 7), в то время как ни производное (1б) (дорожка 1), ни производное фотореагента (2) (дорожка 10) по отдельности не вызывают фотомодификации даже после 100 мин облучения. Сенсibilизированная производным бензантрацена (1а) фотомодификация ДНК в комплексе (IVа) (дорожки 2–4) в данных условиях также практически не наблюдается.

На рис. 3 представлены данные по прямой (кривая 1) и сенсibilизированной олигонуклео-

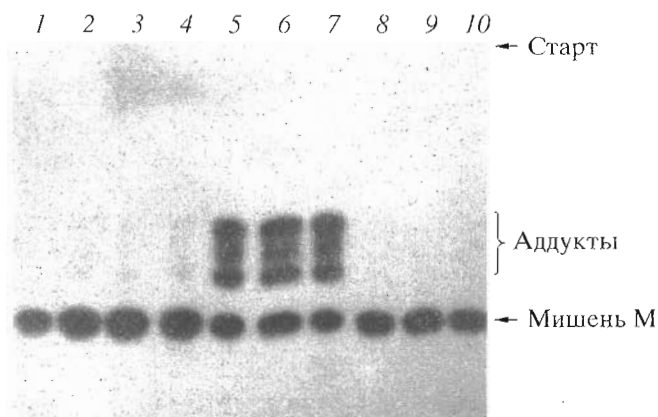


Рис. 2. Радиоавторграф геля, полученный при электрофоретическом анализе продуктов прямой (1, 8–10) и сенсibilизированной (2–7) фотомодификации $5'$ - ^{32}P -меченой мишени М, инициированной облучением видимым светом (440–580 нм) ртутной лампы ДРК-120 фильтрованным набором светофильтров СЗС-23, ЖС-12. Концентрации конъюгатов (1а), (1б), (2) и олигонуклеотидов (3), (4) по 50 мкМ, олигонуклеотида М – 1 мкМ в 2 мМ Na_2HPO_4 , рН 7.1 с 200 мМ NaCl : 1 – дуплекс (1б), $\tau_{\text{обл}}$ 100 мин; 2–4 – дуплекс (IVа), $\tau_{\text{обл}}$ 1, 10, 100 мин соответственно; 5–7 – комплекс (IVб), $\tau_{\text{обл}}$ 1, 10, 100 мин соответственно; 8–10 – комплекс (III), $\tau_{\text{обл}}$ 1, 10, 100 мин соответственно.

тидным производным бензантрацена (кривая 2) и перилена (кривая 3) фотомодификации ДНК-мишени при облучении видимым светом в более широком диапазоне экспозиций (Н). Видно, что 10% выход ковалентных аддуктов сшивки реагента с мишенью в случае сенсibilизированной периленом фотомодификации достигается при значении $\lg H$ 0.3 (кривая 3), а для сенсibilизированной бензантраценом – при $\lg H$ 4.7 (кривая 2) и при $\lg H$ 5.7 в случае прямой фотомодификации (кривая 1). Следовательно, начальная скорость сенсibilизированной производным перилена (1б) фотомодификации ДНК в комплексе (IVб) примерно в 300000 раз больше, а сенсibilизированной производным бензантрацена (1а) – примерно в 10 раз больше, чем прямой фотореакции в комплексе (III).

Из полученных результатов (рис. 2 и 3) следует, что высокоэффективную сенсibilизированную фотомодификацию ДНК в комплексе (IVб) можно селективно проводить в условиях, когда ни производное (1б), ни производное (2) по отдельности не активны.

Позиционную направленность реакции определяли пиперидиновой обработкой продуктов модификации (рис. 4, дорожки 1, 4, 5). При облучении видимым светом комплекса (1б) (дорожка 1) не является никаких продуктов расщепления, следовательно, сенсibilизатор в отсутствие фотореа-

гента не вызывает модификации мишени. Облучение комплекса (III) УФ-светом приводит к образованию небольшого количества аддуктов (дорожка 2), расщепляющихся пиперидином по остатку G^{11} ДНК-мишени (дорожка 4). Сенсibilизированная фотомодификация в комплексе (IVб), инициированная видимым светом, приводит к образованию значительного количества ковалентных аддуктов (дорожка 3), расщепляющихся по тому же остатку гуанозина (дорожка 5). Ранее было показано [15], что при направленной фотомодификации ДНК ковалентные аддукты по остатку гуанозина являются продуктами присоединения синглетного нитрена. Идентичность позиционной направленности прямой и сенсibilизированной фотомодификации показывает, что наиболее вероятным путем возбуждения фотореагента при облучении видимым светом является синглет-синглетная сенсibilизация.

Перенос электрона из азидов в основном состоянии на сенсibilизатор в возбужденном состоянии считается наиболее вероятным механизмом синглет-синглетной сенсibilизации ароматических азидов периленом, хотя перенос электрона не исключает также диполь-дипольного переноса энергии [10]. Оба механизма могут реализовываться параллельно, но вклад переноса электрона увеличивается при росте диэлектрической проницаемости растворителя, которая способствует разделению зарядов. Константа скорости гашения флуоресценции перилена ароматическими азидами увеличивается при росте диэлектрической проницаемости растворителя и достигает диффузионно контролируемого предела в метаноле ($\epsilon = 32$) [10]. Примерно такое же значение диэлектрической проницаемости наблюдается в бороздках двухцепочечной ДНК [16]. Следовательно, обнаруженное значительное увеличение скорости сенсibilизированной производным перилена (1б) фотомодификации ДНК-мишени может быть обусловлено переносом электрона.

Ранее было показано, что в бинарных системах олигонуклеотидных производных сенсibilизаторы пирен и бензантрацен – эффективные катализаторы, ускоряющие фотомодификацию ДНК-мишени и нерасходуемые в ходе реакции [4]. Поэтому для производного перилена (1б) были изучены каталитические свойства и сопоставлены с данными по фотомодификации, сенсibilизированной производным бензантрацена (1а) в оптимальных для этого условиях, – избыток фотореагента, повышенная температура, длительное время облучения (рис. 5).

Видно, что при фотомодификации в комплексе (IVа) (панель а) заметный выход ковалентных аддуктов наблюдается даже при значительном недостатке сенсibilизатора (дорожки 2–5). При

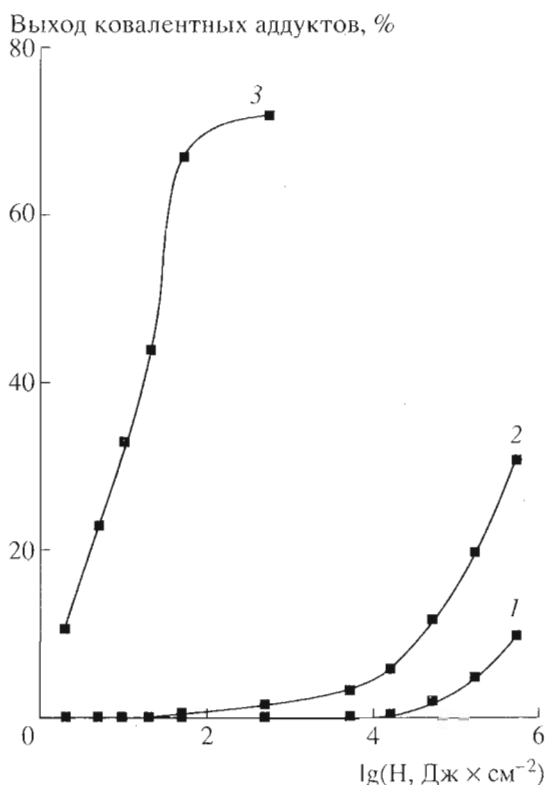


Рис. 3. Зависимость выхода ковалентных аддуктов сшивки ДНК-мишени М с олигонуклеотидным производным (2) при прямой (1) и sensibilizированной олигонуклеотидным производным 1,2-бензантрацена (2) или перилена (3) фотомодификации от экспозиции (H, полулогарифмические координаты). Условия облучения: 1, 2 – светофильтры СЗС-23, ЖС-11 (420–580 нм), расстояние 8 см, W 10 мВт см⁻²; 3 – светофильтры СЗС-23, ЖС-12 (440–580 нм), расстояние 20 см, W 1 мВт см⁻².

увеличении соотношения концентраций [1a]/[M] больше 1 выход аддуктов продолжает увеличиваться и достигает 60% при 10-кратном избытке sensibilizатора (дорожка 8).

Для sensibilizированной фотомодификации в комплексе (IVб) (панель б) наблюдается другая зависимость выхода ковалентных аддуктов от соотношения концентраций sensibilizатор–ДНК–мишень. При значительном недостатке sensibilizатора, фотомодификация практически отсутствует (дорожки 2–3), далее выход ковалентных аддуктов линейно увеличивается при росте соотношения концентраций [1б]/[M] от 0.1 до 3 (дорожки 4–7). Последующее увеличение избытка sensibilizатора приводит к незначительному увеличению эффективности фотомодификации, достигая 70% при 30-кратном избытке производного (1б) (дорожка 9).

Количественные данные по sensibilizированной фотомодификации ДНК в комплексах

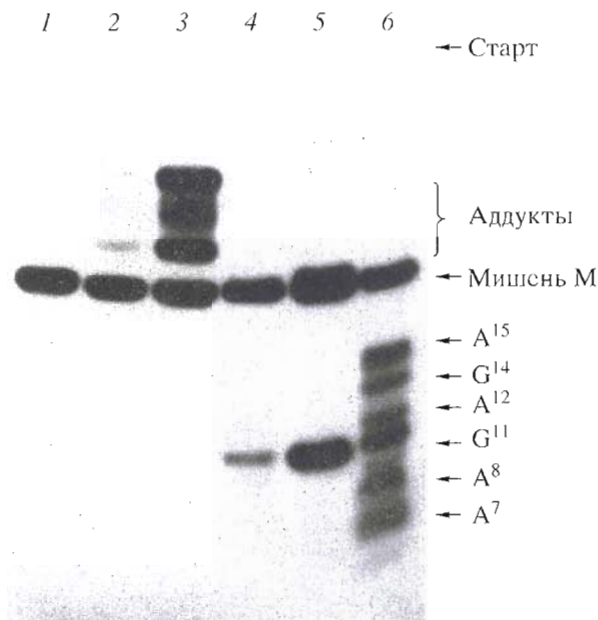


Рис. 4. Радиоавтограф геля, полученный при электрофоретическом анализе продуктов прямой (2, 4) и sensibilizированной олигонуклеотидным производным перилена (1, 3, 5) фотомодификации 5'-³²P-меченой мишени М, концентрации олигонуклеотидов как на рис. 2: 1 – дуплекс (Iб), τ_{обл} 100 мин (450–580 нм); 2 – дуплекс (II), τ_{обл} 100 мин (340–400 нм); 3 – комплекс (IVб), τ_{обл} 10 мин (450–580 нм); 4, 5 – дорожки 2, 3 соответственно после обработки пиперидином (1 М, 95°C, 20 мин); 6 – продукты дегградации ДНК-мишени по остаткам пуринов (А + G-расщепление).

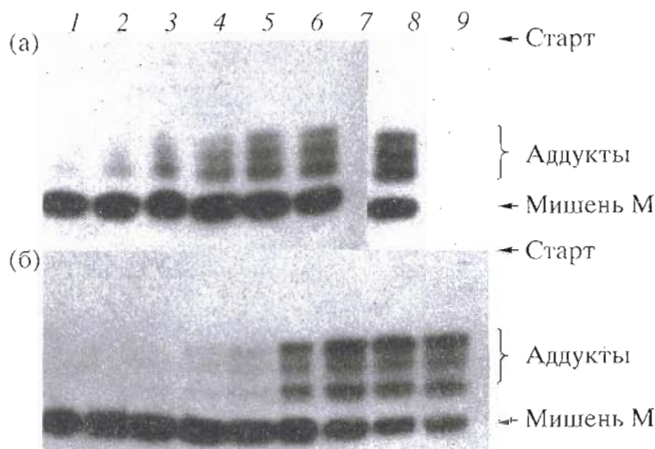


Рис. 5. Радиоавтографы гелей, полученные при электрофоретическом анализе продуктов прямой (1) и sensibilizированной олигонуклеотидными производными бензантрацена (Ia) (а: 2–8) и перилена (Iб) (б: 2–9) фотомодификации 5'-³²P-меченой мишени М при 37°C, концентрации олигонуклеотидов: [M] 1 мкМ, [1a] и [1б] 1 × 10⁻⁸–3 × 10⁻⁵ М, [2] 50 мкМ: панель а: τ_{обл} 50 мин (400–580 нм); концентрация (1a) мкМ 0 (1), 0.01 (2), 0.03 (3), 0.1 (4), 0.3 (5), 1 (6), 10 (8); панель б: τ_{обл} 150 мин (450–580 нм); концентрация (1б) мкМ 0 (1), 0.01 (2), 0.03 (3), 0.1 (4), 0.3 (5), 1 (6), 3 (7), 10 (8), 30 (9).

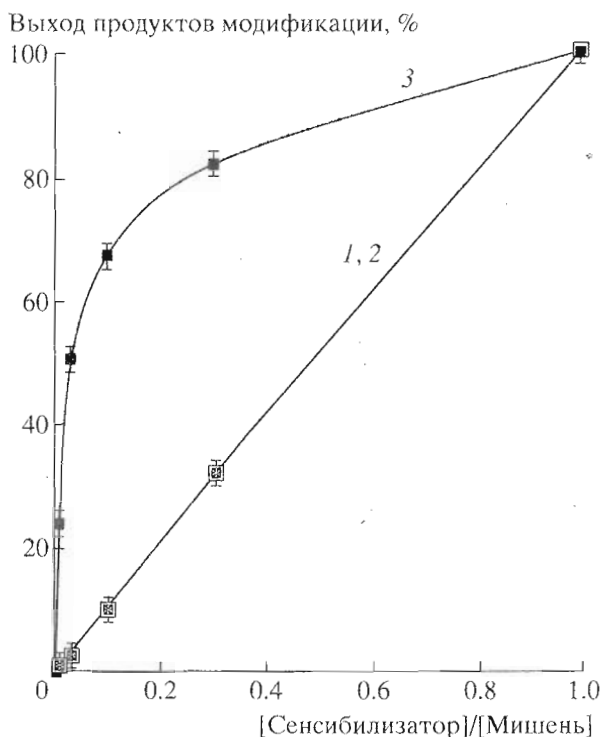


Рис. 6. Зависимость выхода продуктов сенсибилизированной фотомодификации (%) от соотношения концентраций 1б : [M]: 100% соответствует степени модификации при эквимольном соотношении концентраций (1б) и M : [M] 1 мкМ, [2] 50 мкМ, [1б] и [1а] – 0.5–50 мкМ. Прямые 1, 2: * – (1а), 10°C, $\tau_{\text{обл}}$ 10 мин (400–480 нм); □ – (1б), 10°C, $\tau_{\text{обл}}$ 100 мин (440–580 нм); (1б), 37°C, $\tau_{\text{обл}}$ 100 мин (440–580 нм); кривая 3 – ■ – (1а), 37°C, $\tau_{\text{обл}}$ 300 мин (400–480 нм).

(IVa) и (IVб) при недостатке сенсибилизаторов представлены на рис. 6. Видно, что при 100-кратном избытке мишени относительно производного бензантрацена (1а) наблюдается 24% модификации (кривая 3). В отличие от производного бензантрацена (1а), каждая молекула которого способна инициировать фотомодификацию до 24 молекул мишени, каждая молекула конъюгата перилена (1б) вызывает фотомодификацию только одной молекулы мишени (прямая 2). Линейная зависимость степени сенсибилизированной фотомодификации от соотношения концентраций [сенсибилизатор]/[ДНК-мишень] наблюдалась ранее и для производного бензантрацена (1а) [4] при пониженной температуре, эквимольном соотношении фотореагент–мишень, т.е. в условиях отсутствия обмена компонентов комплекса (IVa).

Из представленных на рис. 5 и 6 результатов можно сделать вывод, что при сенсибилизированной производным перилена (1б) фотомодификации ДНК в комплексе (IVб) каталитический эффект сенсибилизатора отсутствует. Возможным

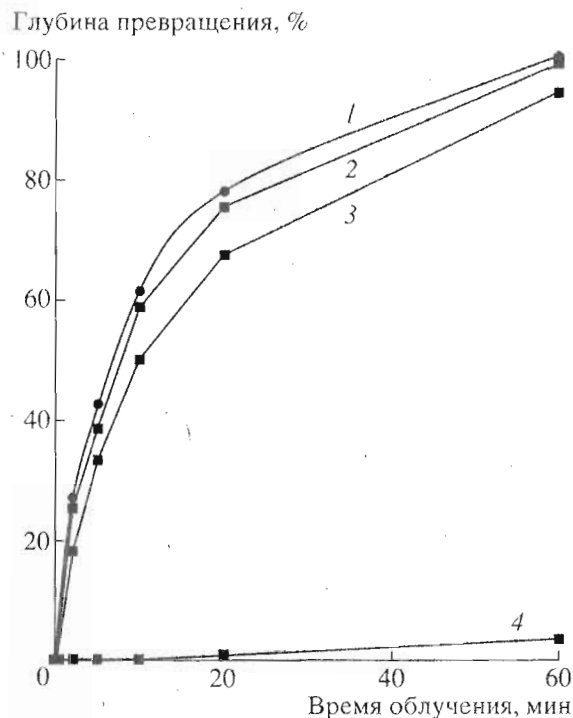
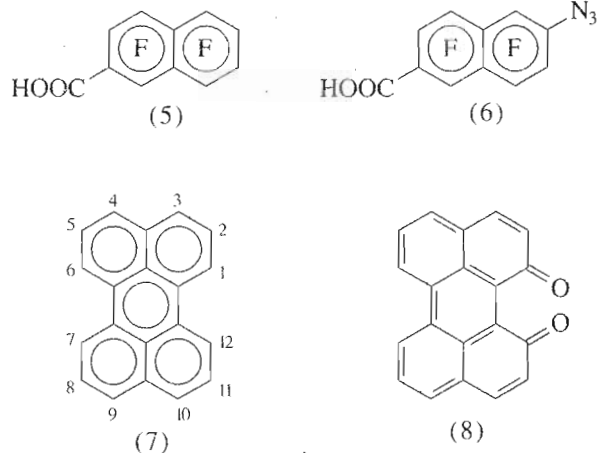


Рис. 7. Фотолиз соединений (5), (6), (7) и их смесей (по 50 мкМ) в метаноле при облучении видимым светом (440–580 нм) в присутствии кислорода и после 20 мин продувки аргоном: 1 – сенсибилизированный периленом фотолиз азида (6) в присутствии кислорода (по уменьшению поглощения при 293 нм); 2 – фотоокисление перилена (7) в присутствии азиды (6) в кислородных условиях (по увеличению поглощения при 450 нм); 3 – фотоокисление перилена в присутствии азиды (6) после 20 мин продувки аргоном; 4 – прямой фотолиз перилена, азиды (6) и смеси перилена–кислота (5).

объяснением этого может быть инактивация сенсибилизатора в ходе фотомодификации ДНК.



Для проверки данного предположения был изучен в кислородных и бескислородных условиях фотолиз перилена (7) и смесей перилена–нафтилазида (6) и перилена–перфторнафтойной кислоты (5) (рис. 7). Перфторнафтойная кислота (5) и

2-азидоперфтор-7-нафтойная кислота (6), описанные ранее [17], выбраны вследствие того, что их спектры поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$ 340 и 345 нм, соответственно) не перекрываются со спектром поглощения перилена ($\lambda_{\text{макс}}$ 251 и 433 нм). При облучении в течение 1 ч видимым светом (440–580 нм) фотолиза ни перилена (7), ни азида (6), ни смеси перилена–перфторнафтойная кислота ни в кислородных, ни в бескислородных условиях не наблюдается. В этих условиях (прямая 4) облучения смеси перилена–2-азидоперфтор-7-нафтойная кислота одновременно происходит фотопревращение как азида, так и перилена с $\tau_{1/2}$ 8 мин (кривые 1, 2). По данным ВЭЖХ перилена практически целиком превращается в соединение, не флуоресцирующее и обладающее характерным для 1,12-периленахинона (8) спектром поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$ 334 и 444 нм) [18]. Можно предположить, что идет фотоокисление перилена кислородом воздуха. При барботировании перед облучением смеси перилена–2-азидоперфтор-7-нафтойная кислота аргонном скорость фотопревращения перилена несколько снижается, но не уменьшается до нуля (кривая 3), видимо из-за неполного удаления кислорода и высокой скорости окисления [21].

При облучении видимым светом комплекса (IVб) в кислородных условиях наблюдаются аналогичные изменения – полное гашение флуоресценции периленового остатка (Sб) и углубление цвета реакционной смеси (данные не представлены). Полученные результаты подтверждают, что при сенсibilизированной фотомодификации ДНК бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов (1б + 2) одновременно с фотопрививкой реагента к мишени происходит фотоокисление сенсibilизатора, вероятно всего за счет фотоиндуцированного переноса электрона.

Перенос электрона с фотовозбужденного сенсibilизатора на азид (рис. 8а) [19] теоретически возможен, но в данном случае маловероятен. Подобный перенос электрона должен приводить к появлению в спектре поглощения смеси новой длинноволновой полосы переноса заряда (ПЗ). Экспериментально в метанольном растворе с концентрациями сенсibilизатора (7) 1 мМ и фотореагента (6) 100 мМ такой полосы не было обнаружено (данные не представлены). Помимо этого, при переносе электрона с сенсibilизатора на азид, из последнего образуется анион-радикал, который в бескислородных условиях быстро превращается в соответствующий анилин [20], а в кислородных – окисляется кислородом [21]. Можно предположить, что при переносе электрона с периленового сенсibilизатора (Sб) на фотореагент (R) фотомодификации ДНК наблюдаться не должно.

Наблюдаемая сенсibilизированная фотомодификация ДНК в комплексе (IVб) обусловлена вероятнее всего переносом электрона с неподеленной электронной пары (*n*) атома азота в азидогруппе фотореагента на фотовозбужденный

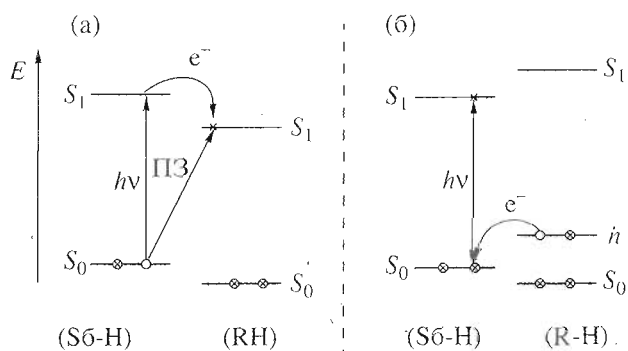


Рис. 8. Расположение электронных уровней при фотоиндуцированном переносе электрона (а) – с сенсibilизатора (S) на фотореагент (R) (при $E_{0,0}$ сенсibilизатора $> E_{0,0}$ фотореагента) и (б) – с фотореагента на сенсibilизатор (с арилазида (R-H) на перилена (Sб-H); $E_{0,0}$ сенсibilизатора $< E_{0,0}$ фотореагента).

перилена (рис. 8б). В результате этого из остатка перилена образуется анион-радикал, который быстро окисляется кислородом воздуха до соответствующего 1,12-периленахинона. Одновременно с этим из перфторарилазида образуется катион-радикал, который в ходе темновых превращений вызывает фотомодификацию ДНК, характерную для синглетного нитрена.

Таким образом, разработана высокоэффективная бинарная система олигонуклеотидных реагентов, несущих остатки перилена и перфторарилазида, позволяющая селективно инициировать фотомодификацию ДНК-мишени облучением видимым светом в сине-зеленом диапазоне (450–580 нм) в условиях, когда оба компонента этой системы по отдельности практически не активны. Сенсibilизированная фотомодификация в комплексе (IVб) осуществляется, вероятнее всего, за счет фотоиндуцированного переноса электрона с азидогруппы реагента на электронно-возбужденный сенсibilизатор. Позиционная направленность такой фотомодификации ДНК совпадает с позиционной направленностью прямой фотомодификации в комплексе (III) и сенсibilизированной за счет синглет-синглетного переноса энергии в комплексе (IVа).

Сенсibilизация за счет фотоиндуцированного переноса электрона позволяет увеличить скорость сенсibilизированной фотомодификации в 300000 раз по сравнению с прямой. В отличие от сенсibilизации за счет синглет-синглетного переноса энергии, при которой сенсibilизатор может функционировать как нерасходуемый катализатор, при сенсibilизации за счет переноса электрона происходит фотоокисление сенсibilизатора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали алюмогидрид лития, 2,2'-дипиридилдисульфид, трифенилфосфин, 4-N,N-диме-

тиламинопиридин (Fluka), остальные реактивы и растворители – отечественного производства. ИК-спектры регистрировали на приборе UR-20 в таблетках KBr. 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), ¹H-ЯМР-спектры – на приборе Bruker-200A, внутренний стандарт – гексаметилдисульфоксан.

Для выделения олигонуклеотидных производных применяли метод ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Waters (США) в системе – линейный градиент концентрации ацетонитрила в 0.05 М LiClO₄ от 0 до 40% за 40 мин, скорость элюции 3 мл/мин (колонка 25 × 0.4 см, сорбент Nucleosil RP-18, 5–20 мкм (Merck, Германия)). ТСХ проводили на пластинках Silufol (UV₂₅₄) в системе: муравьиная кислота–трет-бутанол–метилэтилкетон–вода – 3 : 8 : 6 : 3.

3-Аминометилперилен гидрохлорид (Sб-Н · HCl). К суспензии 0.5 г (13.2 ммоль) LiAlH₄ в 20 мл абс. эфира в токе сухого аргона добавляли 1 г (3.4 ммоль) оксима 3-формилперилена, полученного по [14], перемешивали 12 ч, добавляли по каплям 1.5 мл насыщенного раствора Na₂SO₄. Реакционную смесь фильтровали, осадок экстрагировали горячим хлороформом, экстракт сушили над MgSO₄, упаривали досуха, остаток промывали горячим бензолом, затем гексаном, сушили в вакууме. Кристаллический продукт (0.6 г) растворяли в метаноле (10 мл), пропускали ток сухого HCl, высаживали эфиром (20 мл), отфильтровывали осадок и сушили в вакууме. Выход гидрохлорида (Sб-Н) 0.27 г (23%). R_f 0.8, т. пл. 245–247 (разл.).

УФ-спектр (MeOH), λ_{макс}, нм (ε, М⁻¹ см⁻¹): 248 (29000), 252 (44000), 412 (28000), 438 (35000). ИК-спектр (KBr, ν, см⁻¹): 3040 сл. (аром С-Н), 2950–2880 с. шир. (–NH₃⁺), 1600, 1500 с. (аром. С=C),

1580, 1495 ср. (С-NH₃⁺). ¹H-ЯМР (DMSO-d₆, δ, м. д., J, Гц): 8.40 (д, 1 H, J_{1,2} 7.5, H1); 8.35 (д, 2 H, J_{5,6} = J_{7,8} 8, H6, H7); 8.33 (д, 1 H, J_{11,12} 8, H12); 7.90 (д, 1 H, J_{4,5} 8, H4); 7.78–7.82 (м, 2 H, H9, H10); 7.66 (т, 1 H, J_{5,6} 8, H5); 7.59 (д, 1 H, J_{1,2} 7.5, H2); 7.55 (т, 2 H, J_{8,9} = J_{10,11} = J_{11,12} 8, H8, H11); 4.82 (с, 2 H, ArCH₂).

Синтез периленового производного декануклеотида (1б). Растворяли 0.15 мкмоль цетавлоновой соли декануклеотида, содержащего концевую 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 эфира. Осадок дважды промывали эфиром и растворяли в 50 мкл DMSO, содержащего

5 мкмоль соединения (Sб-Н). Смесь выдерживали 1 ч и осаждали олигонуклеотидный материал 15-кратным избытком 2% раствора LiClO₄ в ацетоне. Осадок растворяли в 70 мкл воды и пересаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне. Продукты выделяли методом ВЭЖХ. Выход конъюгата (1б) составлял 60–80%. Спектр поглощения – λ, нм, (ε, М⁻¹ см⁻¹): 256 (125000), 420 (29000), 448 (35000) – соответствует стехиометрическому соотношению олигонуклеотид–сенсibilизатор 1 : 1, если принять, что молекулярный коэффициент поглощения (ε₂₅₆ 125000 М⁻¹ см⁻¹) равен сумме значений для исходного олигонуклеотида (3) (ε₂₅₆ 101000 М⁻¹ см⁻¹) [5] и сенсibilизатора (Sв-Н) (ε₂₅₆ 24000 М⁻¹ см⁻¹).

Флуоресцентные свойства. Спектры флуоресценции перилена, периленилметиламина, олигонуклеотидного производного (1б) и гашение их флуоресценции при образовании дуплексов регистрировали в буфере 6 мМ Na₂HPO₄ (рН 7.6), 0.2 М NaCl и 0.02 мМ EDTA. Длина волны возбуждения λ_{возб} = λ_{макс} ± 5 нм, длина волны эмиссии λ_{эм} 476 ± 5 нм.

Фотомодификация ДНК-мишени. Аликвоты по 5 мкл реакционной смеси, содержащей 100 нМ раствор ДНК-мишени Т и 50 мкМ растворы олигонуклеотидных производных реагента и сенсibilизатора в буфере, содержащем 6 мМ Na₂HPO₄ (рН 7.6), 0.2 М NaCl и 0.02 мМ EDTA, помещали в цилиндрические лунки иммунологических планшетов диаметром 4 мм, закрывали крышками, охлаждали или нагревали до нужной температуры и облучали светом ртутной лампы ДРК-120 осветителя КФ-4М (ЛОМО, Санкт-Петербург) через следующие наборы стеклянных светофильтров (λ, нм; W, мВт см⁻²): БС-8, СЗС-20 (400–480; 0.3); ЖС-11, СЗС-23 (420–580; 1); ЖС-12, СЗС-23 (440–580; 0.85). Интенсивность падающего на образцы видимого света определяли с помощью люксметра Ю-117 [22]. 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 Ultroskane-XL (ЛКВ, Швеция).

Авторы выражают благодарность Е.М. Ивановой (НИБХ СО РАН) за наработку олигонуклеотидов. Настоящая работа была поддержана Междисциплинарным грантом СО РАН по ген-иммунизации и генотерапии и грантом РФФИ № 95-03-08706а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биорган. химия. 1998. Т. 24. С. 829–836.
2. 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.
3. 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. B. Meunier: NATO ASI Series; Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., The Netherlands, 1996. P. 195–210.
4. Dobrikov M.I., Gaidamakov S.A., Gaidamakova E.K., Gainutdinov T.I., Koshkin A.A., Vlassov V.V. // Antisense Nucl. Acid Drug Develop. 1997. V. 7. P. 309–317.
5. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биорган. химия. 1997. Т. 23. С. 191–199.
6. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биорган. химия. 1997. Т. 23. С. 557–563.
7. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Ю., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 358. С.
8. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Докл. РАН. 1996. Т. 351. С. 547–550.
9. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В. // Биорган. химия. 1996. Т. 22. С. 191–199.
10. Leyshon L.J., Reiser A. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2. 1972. P. 1918–1927.
11. Гречишников И.В., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. // Биорган. химия. 1995. Т. 21. С. 70–76.
12. Wilkinson F. // Organic Molecular Photophysics. V. 2 / Eds J. B. Birks. J. London; New York; Toronto; Sydney: Wiley, 1975. P. 95–158.
13. Chow Y.L., Wu Z.-Z., Lau M.-P., Yip R.W. // J. Am. Chem. Soc. 1985. V. 107. P. 8196–8201.
14. Виу-Ной Н.П., Лонг С.Т. // Recl. Trav. Chim. Pags-Bas. 1956. V. 75. P. 1221–1226.
15. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Левина А.С., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // Биорган. химия. 1996. Т. 22. С. 200–207.
16. Barawkar D.A., Ganesh K.N. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 159–164.
17. Тенетова Е.Д., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Штейнгарц В.Д. // Изв. АН. Сер. хим. 1998. (в печати).
18. White B., Novakovska M., Guillet J.E. // J. Photochem. Photobiol. 1989. V. 50. P. 147–156.
19. Мельников М.Я., Смирнов В.А. Фотохимия органических радикалов. М.: МГУ, 1994. С. 90–128.
20. Shields C.J., Falvey D.E., Schuster G.B., Buchardt O., Nielsen P.E. // J. Org. Chem. 1988. V. 53. P. 3501–3507.
21. Bensasson R.V., Land E.R., Truscott T.G. Flash Photolysis and Pulse Radiolysis. Contributions to the Chemistry of Biology and Medicine. Oxford; New York; Toronto; Sydney; Paris; Frankfurt: Pergamon Press, 1983. P. 5–40.
22. Соколов М.В. Прикладная биофотометрия. М.: Наука, 1982. С. 79–116.

Sensitized Photomodification of DNA by Binary Systems of Oligonucleotide Conjugates. IV. Photoinduced Electron Transfer

M. I. Dobrikov[#], S. A. Gaidamakov, T. I. Gainutdinov,
E. D. Tenetova, 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*

The photomodification of single-stranded DNA sensitized to visible light (450–580 nm) by a binary system of oligonucleotide conjugates complementary to adjacent DNA sequences was studied. One oligonucleotide carries a residue of the photoreagent *p*-azidotetrafluorobenzaldehyde hydrazone at its 3'-terminal phosphate, and the other has a residue of the sensitizer, perylene or 1,2-benzanthracene, at the 5'-terminal phosphate. The rate of photomodification sensitized by the perylene derivative is 300000-fold higher than the rate of photomodification in the absence of the sensitizer. Since the excitation energy of perylene is lower than the energy necessary for the initiation of azide photodecomposition, it is likely that the sensitization in the complementary complex occurs by electron transfer from the azido group of the photoreagent to the excited sensitizer. The sensitization by the 1,2-benzanthracene oligonucleotide derivative occurs by means of singlet-singlet energy transfer, which enables this sensitizer to act as a unconsumable catalyst each molecule of which is able to initiate the photomodification of more than 20 DNA molecules. By both mechanisms, the photomodification occurs with high specificity on the G¹¹ residue of the target DNA. The degree of sensitized photomodification reaches 72%.

Key words: azides, perfluoroaromatic; antisense oligonucleotides; DNA, photomodification

[#] To whom correspondence should be addressed.