



УДК 547.963.3:577.113.6

СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК БИНАРНЫМИ СИСТЕМАМИ II*. СПЕКТРАЛЬНАЯ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ. ОДНО- И ДВУХКВАНТОВАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ

© 1997 г. М. И. Добриков[#], С. А. Гайдамаков*, А. А. Кошкин,
Н. П. Лукъянчук, 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. Принята к печати 08.01.97 г.

Изучена спектральная зависимость эффективности фотомодификации при облучении длинноволновым УФ-светом одноцепочечной ДНК-мишени декануклеотидным производным *n*-азидотетрафторбензамида (прямая фотомодификация) и его комплексами с декануклеотидными производными пирена, комплементарными соседнему участку мишени (сенсibilизированная фотомодификация). Сенсibilизация фотомодификации происходит в основном за счет синглет-синглетного переноса энергии с пирена на азид при сближении их в комплементарном комплексе, что позволяет значительно увеличить скорость и степень фотомодификации. При одновременном облучении и УФ- и видимым светом в диапазоне 365–580 нм впервые обнаружена двухквантовая триплет-триплетная сенсibilизация, которая приводит к еще большему ускорению фотомодификации мишени и к изменению ее позиционной направленности с остатка G¹¹ на T¹³. Изменение типа сенсibilизации при смене условий облучения позволяет регулировать реакционную способность бинарной системы олигонуклеотидных производных, не меняя ее состава.

Ключевые слова: перфторарилазиды, двухквантовая сенсibilизация, перенос энергии, сенсibilизированная фотомодификация ДНК.

Фотореакционноспособные производные олигонуклеотидов являются перспективными реагентами для модификации биополимеров, поскольку обладают преимуществами по сравнению с химически активируемыми реагентами. Они позволяют инициировать фотореакцию под действием внешнего мягкого воздействия – света – в любой заданный момент времени. При возбуждении фотоактивные группы превращаются в короткоживущие высокорекционноспособные частицы, способные реагировать с ближайшими группами биополимеров [2, 3].

Для комплементарно-адресованной фотомодификации нуклеиновых кислот из фотоактивных групп чаще всего применяются псоралены [2, 4] и ароматические азиды [3, 5, 6]. Последние отличаются высоким квантовым выходом фотодиссоциации и легкостью синтеза [3]. Из них наиболее эффективными оказались перфторарилазиды [5–8], однако введение в них четырех ато-

мов фтора приводит к гипсохромному сдвигу максимума поглощения [5]. Для батохромного смещения спектральной чувствительности перфторарилазидов в видимую область ранее нами была предложена синглет-синглетная сенсibilизация 9-аминоакридином [9].

Для увеличения специфичности воздействия на определенные последовательности ДНК были сконструированы бинарные системы олигонуклеотидных реагентов, между которыми при сближении в комплементарном комплексе может осуществляться перенос энергии [10]. Показано, что сенсibilизированная таким переносом энергии фотомодификация ДНК-мишени протекает значительно быстрее и более эффективно, чем несенсibilизированная.

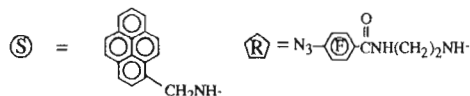
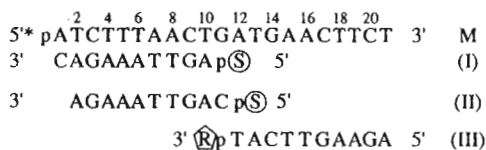
В настоящей работе мы исследовали спектральную зависимость фотомодификации ДНК-мишени олигонуклеотидным реагентом (прямая фотомодификация) и его бинарными системами (сенсibilизированная фотомодификация), а также условия реализации одно- и двухквантовой сенсibilизации.

* Сообщение I см. [1]. Префикс “d” в обозначениях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

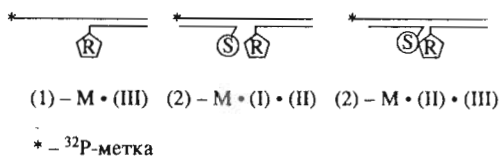
[#] Автор для переписки.

Исследованная система состояла из одноцепочечной ДНК-мишени (М) и комплементарных ей олигонуклеотидных производных, несущих остатки сенсibilизатора – пиренил-1-метиламина (S) и фотореагента – *n*-азидотетрафторбензамидо-*N*-этиламина (R). Состав ДНК-мишени, олигонуклеотидов, образуемых ими комплексов и строение сенсibilизатора и фотореагента представлены на схеме.

Олигонуклеотиды и их производные



Изученные комплексы



Выбор бинарной системы олигонуклеотидных реагентов (длина олигонуклеотидов-адресов, расположение сенсibilизатора на 5'-концевом фосфате производных (I) и (II), фотореагента на 3'-концевом фосфате производного (III), а также длина линкера между сенсibilизатором и олигонуклеотидом-адресом) обоснован в работе [1]. Следует отметить, что производные *n*-азидотетрафторбензойной кислоты при облучении УФ-светом генерируют в основном синглетный нитрен [11, 12]. Олигонуклеотидные производные этого фотореагента позволяют проводить высокоэффективную комплементарно-адресованную фотомодификацию нуклеиновых кислот [5–8]. Максимум поглощения *n*-азидотетрафторбензойной кислоты находится в области 260 нм (ϵ 18000 М⁻¹ см⁻¹), хотя известно, что малоинтенсивное поглощение *ππ**-перехода ароматической азидогруппы простирается до 430 нм [13]. Благодаря этому поглощению и существует возможность сенсibilизации фотолиза перфторарил-азидов R за счет безызлучательного переноса энергии с пирена.

Ранее [10] по гашению флуоресценции пирена при образовании комплексов типа (2) и (3) (схема) были оценены константы ассоциации (K_a) в зави-

симости от состава реакционной смеси. Исходя из этих данных были выбраны следующие условия проведения фотомодификации: [M] 100 нМ, концентрация каждого олигонуклеотидного производного (I)–(III) – 50 мкМ, рН 7.5 и температура 20°C. В этих условиях мишень полностью находится в составе комплексов (1)–(3).

На рис. 1 представлены типичные результаты фотомодификации ДНК-мишени олигонуклеотидом (III): прямой (а) и сенсibilизированной в присутствии олигонуклеотида (II) (б). В обоих случаях наблюдается образование двух ковалентных аддуктов – (X) и (Y), обладающих меньшей электрофоретической подвижностью, чем радиоактивно меченая мишень. Появление этих аддуктов при прямой фотомодификации происходило после облучения в течение 30 мин и более (рис. 1, б), в то время как при сенсibilизированной фотомодификации аддукты регистрировались уже после 15 с облучения (рис. 1, а).

Следовательно, в данных условиях начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации в комплексе (3) примерно в 100 раз больше, чем прямой. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами [10] по сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени M другим олигонуклеотидным фотореагентом, несущим *n*-азидотетрафторбензальгидразонную группу.

Для определения оптимальных условий облучения была изучена зависимость дозы облучения, необходимой для модификации ДНК-мишени на 10% [14], от длины волны облучения. Результаты показали (рис. 2), что и прямая и сенсibilизированная фотореакции инициируются светом с длиной волны до 440 нм, но при облучении светом с длиной волны выше 300 нм значение $E_{0.1}^{-1}$ прямой фотомодификации резко падает, а для сенсibilизированной фотомодификации остается достаточно высокой во всем исследованном диапазоне длин волн (300–440 нм).

Из этих данных можно сделать вывод, что присутствие сенсibilизатора в бинарной системе позволяет увеличить фотоактивность модификации при облучении в полосе поглощения азидов R, но не дает возможность расширить спектральный диапазон выше 440 нм. Это согласуется с условием, необходимым для осуществления синглет-синглетного переноса энергии: спектр поглощения акцептора-фотореагента должен перекрываться со спектром люминесценции донора-сенсibilизатора [15].

Из рис. 3 видно, что спектры возбуждения (кривая 1) и испускания (кривая 2) олигонуклеотидного производного (II) являются практически зеркальным отражением друг друга и имеют характерную для производных пирена колебательную структуру. Для определения условия облучения,

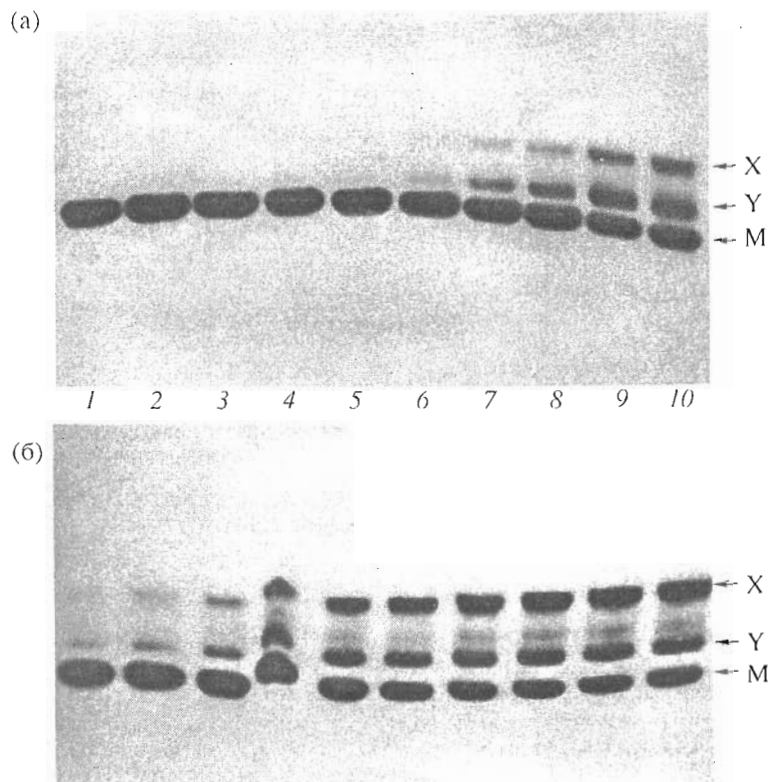


Рис. 1. Радиоавтограф геля, полученного при электрофоретическом анализе продуктов прямой (а) и сенсibilизированной в комплексе (3) (б) фотомодификации олигонуклеотидом (III) 5'-³²P-меченой ДНК-мишени после облучения светом в диапазоне 330–390 нм; концентрации: мишени 100 нМ, олигонуклеотидов (II), (III) – по 50 мкМ, *t* 20°C. Время облучения длинноволновым УФ-светом (мин): 0.25 (1), 0.5 (2), 1 (3), 3 (4), 10 (5), 30 (6), 90 (7), 150 (8), 300 (9), 450 (10).

при которых осуществляется наиболее эффективный перенос энергии, интересно определить зависимость соотношения начальных скоростей сенсibilизированной и прямой фотомодификации (v_0^s / v_0^d) ДНК-мишени от длины волны облучения. Хотя перенос энергии с сенсibilизатора на фотореагент возможен только после поглощения света сенсibilизатором, длина волны, соответствующая максимуму соотношения начальных скоростей (v_0^s / v_0^d) фотомодификации мишени, не совпадает с максимумом его поглощения (рис. 3, 3), но совпадает с 0,0-полосой флуоресценции ($E_{0,0}^s = 76.9$ ккал/моль [16]) пирена (см. ниже). Совпадение максимума отношения (v_0^s / v_0^d) с 0,0-полосой синглет-синглетного перехода ($S_1 \rightarrow S_0$) позволяет предположить, что сенсibilизированная фотомодификация ДНК-мишени фотореагентом осуществляется в основном за счет синглет-синглетного переноса энергии с пирена.

В случае синглет-синглетной сенсibilизации после поглощения кванта УФ-света ($h\nu_1$) молекула сенсibilизатора возбуждается в S_1 -состояние, из которого термодинамически разрешен

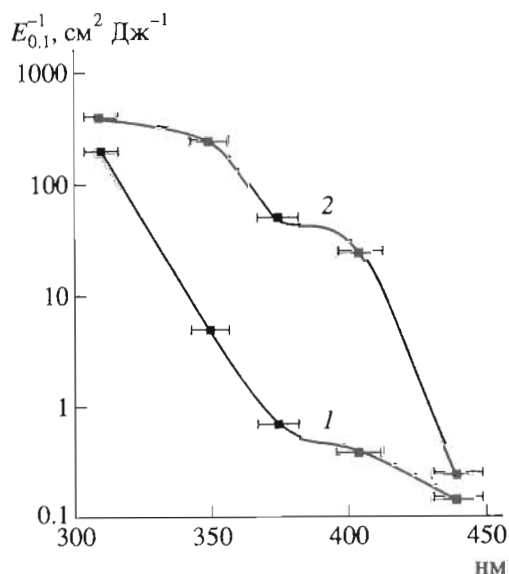


Рис. 2. Зависимость энергии, необходимой для фотомодификации ДНК-мишени на 10% ($E_{0,1}^{-1}$), от длины волны облучения (λ) при проведении прямой и сенсibilизированной фотореакций: 1 – прямая модификация в дуплексе (1); 2 – сенсibilизированная модификация в комплексе (3). Указаны интервалы длин волн облучения с использованными светофильтрами.

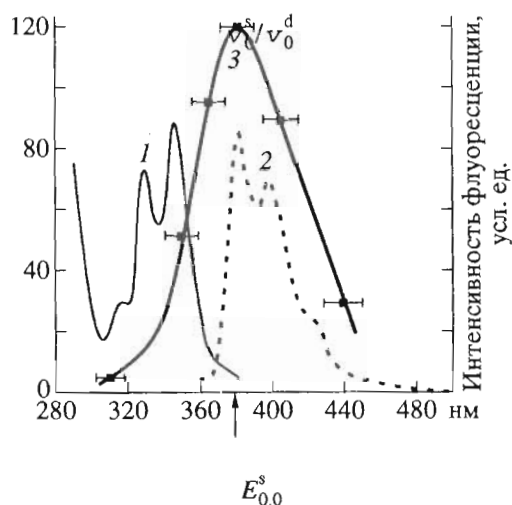


Рис. 3. Спектрально-люминесцентные свойства олигонуклеотидного сенситизатора – производного (II) (1, 2) и зависимость отношения начальных скоростей (v_0^s/v_0^d) накопления ковалентных аддуктов при сенситизированной (s) и прямой (d) фотомодификации ДНК-мишени олигонуклеотидом (III) (3). Условия те же, что на рис. 1. 1 – спектр возбуждения при λ_{em} 374–378 нм; 2 – спектр испускания при λ_{ex} 344–348 нм.

синглет-синглетный перенос энергии на S_1 -уровень фотореагента (рис. 4). 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 в этаноле при 293 К квантовый выход интеркомбинационной конверсии пирена в триплетное состояние ($\Phi_{ISC} = 0.37$) сопоставим с квантовым выходом флуоресценции ($\Phi_F = 0.65$) [17]. Помимо этого пирен обладает интенсивным триплет-триплетным поглощением в видимой области. Из табл. 1 видно, что время жизни триплетного состояния ($\tau_T = 0.5$ с при 77 К в бескислородных условиях) достаточно велико и пирен, находясь в этом состоянии, способен поглотить второй квант, в данном случае видимого света ($h\nu_2$), и перейти на более высокие триплетные уровни (рис. 4). Энергии возбужденных триплетных уровней пирена ($E(T_2) = 77.8$, $E(T_3) = 85$ и $E(T_4) = 102$ ккал/моль [16]), которые заселяются при облучении видимым светом, намного больше, чем энергия триплетного уровня азида ($E(T_3) \approx 68$ ккал/моль [13]). Следовательно, триплет-триплетный перенос энергии с сенситизатора 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

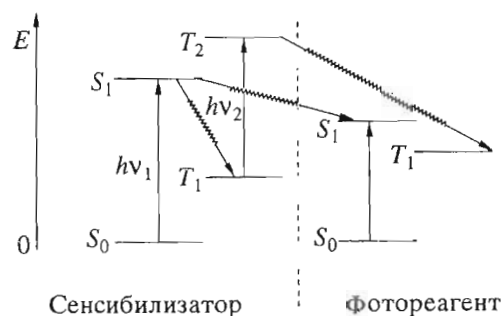


Рис. 4. Диаграмма Яблонского для графического отображения основных и возбужденных электронных состояний сенситизатора и фотореагента.

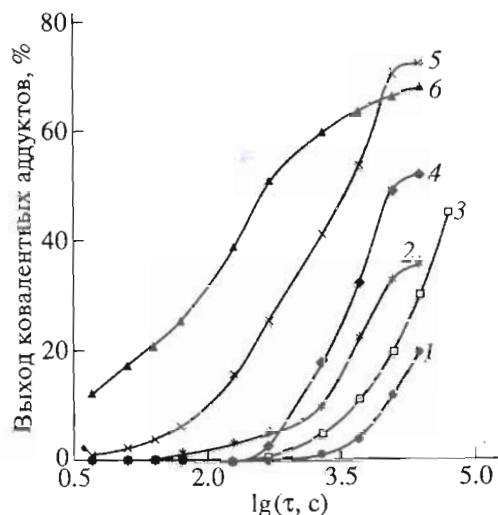


Рис. 5. Выход ковалентных аддуктов (%) при проведении прямой (1, 3, 4) и сенситизированной фотомодификации (2, 5, 6) в зависимости от времени облучения в диапазоне длин волн, нм: 400–580 (1, 2), 365–390 (3, 5), 365–580 (4, 6).

модификации с ДНК-мишенью, характерные для этой бирадикальной частицы. В принципе по этим продуктам фотомодификации ДНК-мишени можно определить, какой из механизмов сенситизации преимущественно реализуется.

Кинетические кривые накопления ковалентных аддуктов при проведении прямой и сенситизированной фотомодификации ДНК-мишени при различных условиях облучения (рис. 5) свидетельствуют о том, что облучение смешанным светом (УФ и видимым) в диапазоне 365–580 нм ускоряет прямую фотомодификацию почти в 100 раз по сравнению с облучением в УФ-диапазоне 365–390 нм (кривые 4 и 3 соответственно) – вероятнее всего, за счет увеличения интенсивности УФ-света. В то же время облучение в диапазоне 365–580 нм ускоряет сенситизированную

Таблица 1. Спектрально-люминесцентные свойства пирена; энергии возбужденных уровней $E(S_1)$, $E(T_1)$, $E(T_2)$ (ккал/моль), максимумы (λ , нм) и молярные коэффициенты поглощения (ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) электронных переходов, квантовые выходы флуоресценции (Φ_F) и интеркомбинационной конверсии (Φ_{ISC}), времена жизни флуоресценции (τ_F , нс) и фосфоресценции τ_T , с)

$S_0 \longleftrightarrow S_n$ -переходы					$S \longleftrightarrow T$ -переходы		$T_1 \longleftrightarrow T_n$ -переходы				
λ	ϵ	$E(S_1)$	Φ_F	τ_F	Φ_{ISC}	τ_T	λ	ϵ	$E(T_1)$	$E(T_2)$	Литература
		76.9		530			415, 520	48200, 12500	48.3	77.8	16
			0.65		0.37						17
341	37000					0.5					18*

* При 77 К в бескислородных условиях.

фотомодификацию в комплексе (3) примерно в 300 раз по сравнению с облучением в диапазоне 365–390 нм и вызывает некоторое снижение максимального выхода ковалентных аддуктов с 73 до 69% (кривые 6 и 5). Облучение только видимым светом в диапазоне 400–580 нм приводит к резкому снижению скорости прямой и сенсibilизированной фотомодификации (кривые 1 и 2). При облучении более длинноволновым видимым светом в диапазоне 470–580 нм не наблюдается ни прямой, ни сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени (данные не представлены).

Следовательно, одновременное облучение и УФ- и видимым светом вызывает более значительное увеличение скорости сенсibilизированной фотомодификации по сравнению с прямой и сопровождается некоторым снижением выхода ковалентных аддуктов. Эти данные позволяют предположить наличие еще одного механизма сенсibilизации фотомодификации ДНК-мишени.

Чтобы более точно выявить влияние длины волны облучения на скорость фотомодификации, были сопоставлены начальные скорости накопления ковалентных аддуктов при прямой и сенсibilизированной фотомодификации при облучении в указанных выше диапазонах длин волн (табл. 2).

Оказалось, что начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации выше, чем начальная скорость прямой: при облучении видимым светом (400–580 нм) – в 10 раз, при облучении УФ-светом (365–390 нм) – в 59 раз и при одновременном облучении УФ- и видимым светом (365–580 нм) – в 315 раз. Такое значительное ускорение сенсibilизированной фотомодификации при облучении в диапазоне 365–580 нм при несколько сниженном выходе ковалентных аддуктов (рис. 5, 6) объясняется тем, что возможен и другой, даже более эффективный механизм сенсibilизации. Таким механизмом может быть двухквантовая триплет-триплетная сенсibilизация [17], энергетическая диаграмма которой представлена на рис. 4.

Поскольку при триплет-триплетном переносе энергии должна генерироваться бирадикальная частица – триплетный нитрен, обладающий отличной от электрофильного синглетного нитрена реакционной способностью [19], это должно приводить к изменению позиционной направленности сенсibilизированной фотомодификации. Известно, что пиримидиновые основания более склонны к реакциям радикального характера, а пуриновые основания легче вступают в электрофильные реакции [20]. В связи с этим была изучена позиционная направленность прямой и сенсibilизированной фотомодификации мишени. Для этого облученные образцы обрабатывали пиперидином, что позволяет выявить модифицированные основания ДНК-мишени. Полученные данные представлены на рис. 6 и в табл. 3. Ковалентные аддукты Y и X, которые по электрофоретической подвижности предположительно могут быть продуктами присоединения соответственно одного и двух олигонуклеотидных производных (III) к мишени, были выделены и обработаны пиперидином. При этом из аддукта X (рис. 6, 1) образуются продукты, совпадающие по подвижности с аддуктом Y, мишенью, и наблюдается расщепление мишени по остатку G¹¹. При обработке пиперидином аддукта Y (дорожка 2) происходит образование продукта, совпадающего по подвижности с мишенью, и расщепление ее по остатку G¹¹.

Таблица 2. Начальные скорости накопления ковалентных аддуктов при прямой (v_0^d) и сенсibilизированной (v_0^s) фотомодификации ДНК-мишени и их отношение при облучении светом в разных диапазонах длин волн (λ , нм)

λ , нм	365–390	400–580	365–580
v_0^s , мин ⁻¹	0.13	0.011	4.1
v_0^d , мин ⁻¹	0.0022	0.0011	0.013
v_0^s/v_0^d	59	10	315

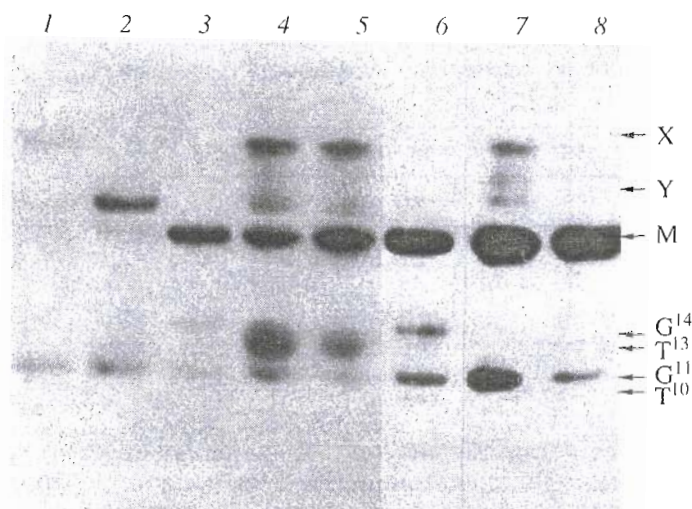


Рис. 6. Радиоавтографы реакционных смесей пиперидинового расщепления продуктов прямой и сенсibilизированной фотомодификации $5'$ - ^{32}P -меченой ДНК-мишени в разных условиях облучения. Пиперидиновому расщеплению подвергали верхний аддукт (X) (1) и нижний аддукт (Y) (2) после сенсibilизированной фотомодификации в дуплексе (3), λ 365–390 нм, τ 180 мин. 3, 6 – G-специфичное расщепление ДНК-мишени. Сенсibilизированная фотомодификация в дуплексах (3) и (2) (дорожки 4, 5 соответственно), λ 365–580 нм, τ 180 мин; в дуплексе (3), λ 365–390 нм, τ 60 мин (7). 8 – прямая фотомодификация в дуплексе (1), λ 365–580 нм, τ 60 мин.

При обработке пиперидином реакционных смесей, полученных при сенсibilизированной фотомодификации мишени в дуплексах (3) и (2) облучением в диапазоне 365–580 нм, расщепление мишени происходит в основном по остатку T^{13} и частично по остатку G^{11} (дорожки 4, 5 соответственно). Прямая модификация в дуплексе (1) (дорожка 8) и сенсibilизированная в дуплексе (3) (дорожка 7) при облучении в УФ-диапазоне приводит к расщеплению мишени исключительно по остатку G^{11} .

Во всех случаях при фотомодификации наблюдается образование стабильных и лабильных

к пиперидиновой обработке продуктов модификации ДНК-мишени. Суммарные степени сенсibilизированной модификации при облучении в диапазонах 365–390 и 365–580 нм практически одинаковы, но позиционные направленности пиперидинзависимой модификации заметно различаются.

Основной точкой прямой пиперидинзависимой модификации во всех диапазонах облучения является основание G^{11} . Это говорит в пользу того, что во всех случаях, вероятнее всего, генерируется одна и та же реакционноспособная частица – синглетный нитрен. Суммарная степень прямой

Таблица 3. Данные по пиперидиновому расщеплению мишени после облучения при разных длинах волн в течение 5 ч*

Фотомодификация	λ , нм	Немодифицированная мишень	Общая степень модификации	Нерасщепившиеся аддукты	Расщепление по остаткам			
					T^{10}	G^{11}	A^{12}	T^{13}
Прямая, дуплекс (1)	330-365	46	54	31	0	23	0	0
	365-390	57	43	24	0	18	1	0
	400-580	88	12	0	0	12	0	0
	365-580	53	47	8	10	25	2	2
Сенсibilизированная, комплекс (2)	330-365	57	43	18	0	25	0	0
	365-390	44	56	21	2	31	2	0
	365-580	44	56	18	4	8	4	22
комплекс (3)	365-390	27	73	23	1	31	11	7
	400-580	80	20	10	0	10	0	0
	365-580	26	74	18	4	13	4	32

* Приведен состав реакционной смеси (%) в соответствии с рис. 6.

фотомодификации максимальна (54%) при облучении в УФ-диапазоне (330–365 нм), т.е. в том диапазоне, где азид R наиболее фотоактивен.

В случае сенсibilизированной фотомодификации основной точкой расщепления мишени пиперидином является основание G¹¹ при облучении только УФ-светом или только видимым светом. При одновременном облучении и УФ- и видимым светом в комплексах (2) и (3) фотомодификация протекает преимущественно по основанию T¹³. Фотомодификация по основанию G¹¹ наблюдается, но в значительно меньшей степени. Комплементарно-адресованная фотомодификация по пиримидиновым основаниям была отмечена ранее для нитроарилазидов [6], для которых характерно образование триплетного нитрена. Следовательно, полученные данные по пиперидиновому расщеплению продуктов фотомодификации ДНК-мишени согласуются с предполагаемым двухквантовым триплет-триплетным механизмом сенсibilизации.

В целом одновременное облучение УФ- и видимым светом позволяет дополнительно ускорить сенсibilизированную фотомодификацию. В этих условиях начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации в 315 раз выше прямой.

Обнаруженный эффект изменения реакционной способности фотореагента в зависимости от условий облучения и предполагаемый двухквантовый механизм сенсibilизации, безусловно, нуждается в дальнейшем изучении и уточнении, но уже сейчас открывает новые возможности для использования регулирования реакционной способности в практических целях. Например, при проведении сенсibilизированной фотомодификации в триплексах можно, ничего не меняя в системе, направлять фотореакцию либо на пуриновую цепь, либо на пиримидиновую. Данный подход по регуляции реакционной способности с помощью одно- и двухквантовой сенсibilизации может иметь большое значение и для изучения белково-нуклеиновых взаимодействий в сложных биологических комплексах – хроматин, рибосомы, репликативный комплекс и т.д., так как дает возможность избирательно проводить модификацию либо белка, либо нуклеиновой кислоты в месте их контакта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез и свойства использованных в работе олигонуклеотидных производных описаны ранее [1].

Фотомодификация ДНК-мишени (М). Реакционные смеси (5 мкл), содержащие 100 нМ ДНК-мишень и 50 мкМ олигонуклеотидные производные (реагент и сенсibilизатор) 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, охлаждали до 4°C и облучали светом ртутной лампы ДРК-120 осветителя КФ-4М (ЛОМО, Санкт-Петербург) через следующие наборы стеклянных светофильтров (λ, нм; W, мВт см⁻²): ЖС-3, УФС-2 (300–315; 0.1); БС-6, УФС-6 (330–365; 0.3); БС-7, УФС-5 (365–390; 0.15); БС-6, УФС-5 (330–390; 0.5); ЖС-10, ПС-13 (400–415; 0.1); ЖС-11, СС-15 (415–455; 0.15); ЖС-10, СС-2 (400–580; 0.95); БС-7, СС-2 (365–580; 1.1). Интенсивность падающего на образцы УФ-света определяли с помощью ферриоксалатного актинометра [21], видимого – 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% ксиленианола 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).

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. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 191–199.
2. Helene C., Toulme J.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1049. P. 99–125.
3. Geiger M.W., Elliot M.M., Karacostas V.D., Moricone T.J., Salmon J.B., Sideli V.L., Onge M.A. // Photochem. Photobiol. 1984. V. 40. P. 545–548.
4. Pathak M.A., Fitzpatrick T.B. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 1992. V. 14. P. 3–22.
5. 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. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.
6. Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 1190–1196.
7. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Халимская Л.М. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 21–29.

8. *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.
9. *Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В.* // *Био-орган. химия*. 1996. Т. 22. С. 191–199.
10. *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.
11. *Schnapp K.A., Poe R., Leyva E., Soundararajan N., Platz M.S.* // *Bioconj. Chem.* 1993. V. 4. P. 172–177.
12. *Schnapp K.A., Platz M.S.* // *Bioconj. Chem.* 1993. V. 4. P. 178–183.
13. *Leyshon L.J., Reiser A.* // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*. 1972. P. 1918–1927.
14. *Алфимов М.В., Назаров В.Б., Якушева О.Б.* // *Успехи научн. фотогр.* 1978. Т. 19. С. 229–238.
15. *Geacintov N.E., Zhao R., Kuzmin V.A., Kim S.K., Pecora L.J.* // *Photochem. Photobiol.* 1993. V. 58. P. 185–194.
16. *Labhart H., Heinzermann W.* // *Organic Molecular Photophysics*. V. 1 / Eds J.B. Birks. London; New York; Toronto; Sydney: Wiley, 1973. P. 297–355.
17. *Wilkinson F.* // *Organic Molecular Photophysics*. V. 2 / Eds J.B. Birks. London; New York; Toronto; Sydney: Wiley, 1975. P. 95–158.
18. *Birks J.B.* // *Organic Molecular Photophysics*. V. 1 / Eds J.B. Birks. London; New York; Toronto; Sydney: Wiley, 1973. P. 1–55.
19. *Poe R., Schnapp K., Young M.J.T., Grayzar J., Platz M.S.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 5054–5067.
20. *Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Свердлов Е.Д., Симукова Н.А., Турчинский М.Ф., Шибяев В.Н.* *Органическая химия нуклеиновых кислот*. М.: Химия, 1970. С. 310–400.
21. *Калверт Дж., Питтс Дж.* *Фотохимия*: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 635.
22. *Соколов М.В.* *Прикладная биофотометрия*. М.: Наука, 1982. С. 79–116.

Sensitized Photomodification of DNA with Binary Systems.

II. Spectral Photosensitivity: One- and Two-Photon Sensitization

M. I. Dobrikov*, S. A. Gaidamakov**, A. A. Koshkin*,
N. P. Luk'yanchuk*, G. V. Shishkin*, and V. V. Vlasov*

* *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, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract—The efficiency of the photomodification of target single-stranded DNA with a decanucleotide derivative of *p*-azidotetrafluorobenzamide (direct photomodification) and with its complexes with decanucleotide derivatives of pyrene complementary to the adjacent segment of the target (sensitized photomodification) was studied as a function of the wavelength of long-wave UV light. The sensitized photomodification occurs mainly by singlet–singlet energy transfer from pyrene to azide in their complementary complex, which allows a significant increase in the rate and level of photomodification. When irradiation occurred simultaneously in the UV and visible regions (365–580 nm), two-photon triplet–triplet sensitization was revealed for the first time, which leads to a still greater acceleration of the target modification and a change of its site-direction from the G¹¹ to T¹³ residue. The change of the mode of sensitization depending on the irradiation conditions allows the regulation of the reactivity of the binary system of oligonucleotide derivatives without altering their composition.

Key words: perfluoroarylazides, two-photon sensitization, energy transfer, sensitized DNA photomodification