



## СИНТЕЗ КОНЬЮГАТА ТЕТРАКАРБОКСИФТАЛОЦИАНИНА КОБАЛЬТА(II) С ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОМ, РЕАГЕНТА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ДНК

© 2000 г. В. В. Коваль, А. А. Чернонос\*, Т. В. Абрамова, Т. М. Иванова, О. С. Федорова<sup>#</sup>, Д. Г. Кнорре

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

\*Новосибирский государственный университет, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 22.04.99 г. Принята к печати 10.08.99 г.

Синтезирован конъюгат дезоксирибоолигонуклеотида  $pd(TCTCCCA)$  с тетракарбоксифталоцианином кобальта(II). Карбоксильные группы фталоцианина превращали в *N*-оксисукцинимидные сложноэфирные с помощью DCC. Эфир фталоцианина в DMF смешивали с водным раствором олигонуклеотида, к которому по 5'-концевой фосфатной группе был присоединен 1,3-диаминопропановый линкер. Полученный конъюгат испытан во внутридуплексной реакции с 14- и 22-мерными олигонуклеотидами-мишенями, содержащими последовательности, комплементарные нуклеотидному остатку конъюгата. В присутствии  $O_2$  и тиола в качестве сопряженного восстановителя (2-меркаптоэтанол, дитиотреит) или  $H_2O_2$  наблюдалась специфичная к последовательности модификация фрагмента ДНК, которая при обработке пиперидином приводила к расщеплению мишени.

*Ключевые слова:* фталоцианин; олигонуклеотид; модификация ДНК.

### ВВЕДЕНИЕ

Для повышения направленности действия химических реагентов на нуклеиновые кислоты в 1967 г. Н.И. Гринева было предложено присоединять реакционноспособные группы к олигонуклеотидам, способным направить (адресовать) их на участок мишени, комплементарный адресующему олигонуклеотиду [1]. Позднее олигонуклеотиды, их производные, в том числе и реакционноспособные, а также различные аналоги привлекли внимание исследователей как возможные противовирусные и противоопухолевые препараты [2].

Одноцепочечные олигонуклеотиды и их производные в первую очередь могут быть направлены на мРНК с целью ингибирования процесса трансляции, а также на вирусные РНК или одноцепочечные ДНК для контроля процессов репликации или транскрипции (антисмысловые олигонуклеотиды) [3–6].

В настоящее время для получения реакционноспособных производных олигонуклеотидов в них вводят различные химически активные группы: термически активируемые, фотоактивируемые и каталитически активные [2]. В связи с этим

представляют интерес соединения порфиринов и их аналогов как в форме металлокомплексов, так и неметаллированные. Неметаллированные порфирины и их комплексы с диамагнитными металлами (Zn, Al, Pd) обладают фотохимической активностью за счет фотосенсибилизации синглетного молекулярного кислорода, а также в связи с возможностью прямой реакции возбужденного порфирина с нуклеиновой кислотой [7]. Первое адресованное фотоактивное производное на основе Pd-копропорфирина описано в работе [8]. Второй вариант использования порфиринов в качестве реакционноспособных групп – это применение их комплексов с ионами переходных металлов. Такие соединения способны катализировать окислительную деструкцию ДНК и РНК с помощью  $O_2$ ,  $H_2O_2$  и других окислителей. Первые модифицированные олигонуклеотиды, содержащие железопорфириновый фрагмент, получены на основе метилпирропорфирина Fe(II) [9, 10] и гемина [11]. В дальнейшем были синтезированы производные, содержащие различные остатки порфиринов и их аналогов, как для фотохимической, так и для окислительной адресованной деструкции нуклеиновых кислот [12–19].

Подобными свойствами обладают синтетические аналоги порфиринов – фталоцианины (тетрабензотетраазпорфирины). По сравнению с порфиринами они обладают рядом достоинств. Во-первых, электронный спектр фталоцианинов

Сокращения: Ptc – остаток фталоцианина; DMAP – 4-диметиламинопиридин.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (3832) 34-42-74; факс: (3832) 33-36-77; e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru).



сдвинут в длинноволновую область, поэтому они могут быть возбуждены светом с длиной волны более чем 600 нм, что существенно для применения этих соединений в фотодинамической терапии [20]. Во-вторых, химически они более стабильны, чем порфирины.

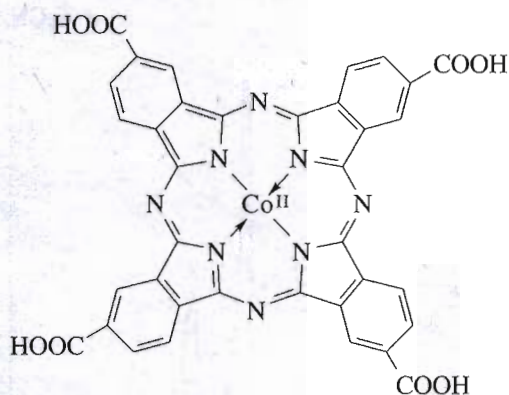
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель настоящей работы – синтез конъюгатов фталоцианинов с дезоксирибоолигонуклеотидами и испытание активности полученных соединений для направленной химической модификации ДНК в присутствии O<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В качестве примера был выбран тетракарбокситефталоцианин Co(II). В настоящее время разработаны методы получения конъюгатов олигонуклеотидов с различными соединениями, содержащими карбоксильные группы. Эти группировки превращают в активированные сложные эфиры, а в олигонуклеотиды вводят линкеры с алифатическими аминогруппами [21], с которыми активированные карбоксильные группы способны образовывать амидные связи.

Синтез конъюгата тетракарбокситефталоцианина Co(II) с олигонуклеотидом рd(TCTTCCCA) проводили по схеме 1. Сначала получали производное дезоксирибоолигонуклеотида, содержащее на 5'-концевой фосфатной группе линкер с алифатической аминогруппой. Для этого проводили активацию 5'-концевого фосфата олигонуклеотида смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии DMAP [22], и затем конденсировали в водном растворе с 1,3-диаминопропаном. Модифицированный таким образом олигонуклеотид последовательно смешивали с двумя порциями раствора N-оксисукцинимидного эфира тетра-4-карбокситефталоцианина Co(II) в DMF (N-оксисукцинимидный эфир фталоцианина получали по схеме 2). После окончания реакции непрореагировавшие сложноэфирные группы гидролизовали раствором карбоната натрия. Полученный конъюгат отделяли от избытка несвязанного фталоцианина гель-фильтрацией на сефадексе G-25.

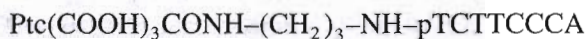
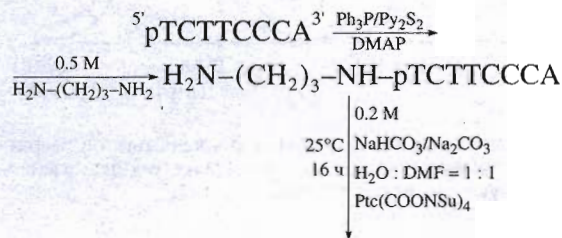
Фракцию, соответствующую олигонуклеотидному материалу, разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 1). Выход продукта в разных экспериментах составлял от 15 до 30%.

Из электронных спектров водных растворов полученного конъюгата и свободного фталоцианина (рис. 2) видно, что после присоединения олигонуклеотида к фталоцианину существенно изменяется форма спектра и соотношение интенсивностей полос фталоцианина в области 600–700 нм. Если у свободного фталоцианина более интенсивна полоса при 678 нм, то для олигонуклеотидного производного более интенсивно поглоще-



Тетра-4-карбокситефталоцианин кобальта(II) (Ptc(COOH)<sub>4</sub>)

ние при 631 нм. Кроме того, появляется максимум при приблизительно 260 нм, что, очевидно, связано с вкладом в спектр поглощения конъюгата его олигонуклеотидной части. Для свободного тетра-4-карбокситефталоцианина Co(II) значение молярного коэффициента поглощения при 678 нм известно и составляет приблизительно 8 × 10<sup>4</sup> М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Вследствие существенных изменений спектра фталоцианина в составе конъюгата не представляется возможным использовать эту величину для расчета концентрации полученного производного. Поскольку, как видно из того же спектра, фталоцианин, как и олигонуклеотид, поглощает в области 260 нм, для определения молярного коэффициента поглощения олигонуклеотида необходимо соотнести его поглощение с абсолютным количеством нуклеотида. С этой целью



где Ptc(COONSu)<sub>4</sub> – тетрасукцинимидный эфир тетракарбокситефталоцианина Co(II).

Схема 1.

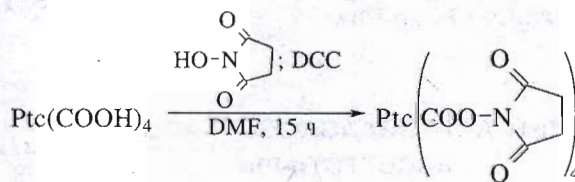


Схема 2.



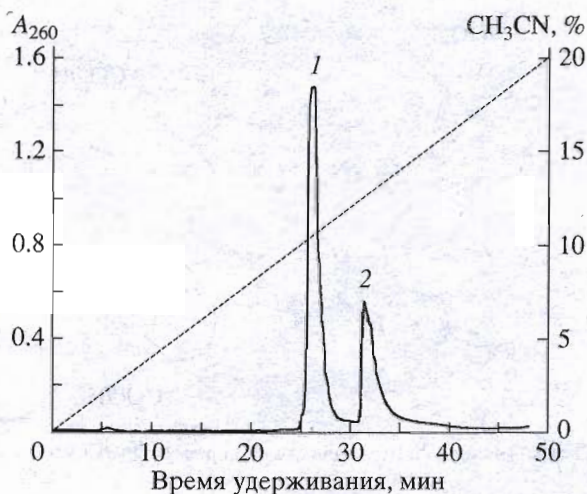


Рис. 1. Хроматографическое разделение (офВЭЖХ) реакционной смеси синтеза конъюгата тетракарбокситфаллоцианина кобальта(II) с олигонуклеотидом  $pd(TCTTCCCA)$ . 1 – исходный нуклеотид, 2 – конъюгат.

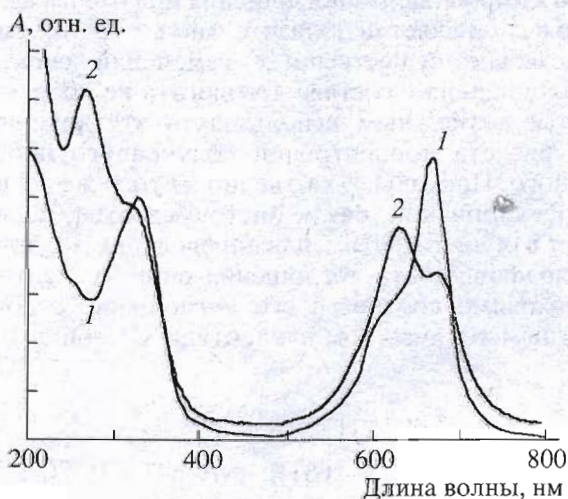
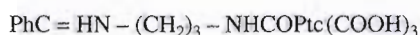
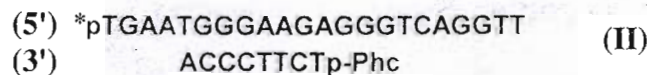
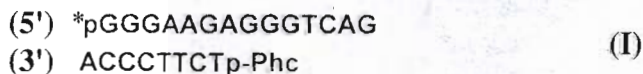


Рис. 2. Оптические спектры водных растворов тетра-4-карбокситфаллоцианина  $Co(II)$  (1) и его конъюгата с олигонуклеотидом  $pd(TCTTCCCA)$  (2).

в олигонуклеотид по 5'-концу стандартным методом (фосфорилирование с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  в присутствии полинуклеотидкиназы) вводилась радиоактивная метка. Сопоставлением радиоак-



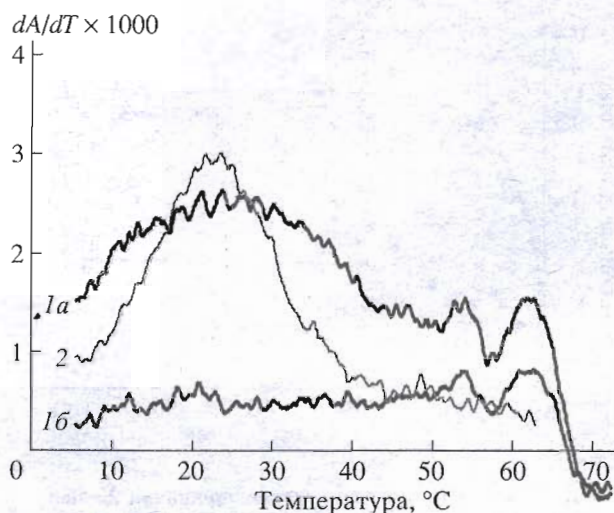
тивности с поглощением олигонуклеотида при 260 нм и с использованием рассчитанного по работе [23] его молярного коэффициента поглощения определили молярную радиоактивность олигонуклеотида. Полученная величина использовалась для определения количества полученного с радиоактивно меченым нуклеотидом конъюгата. Это позволило также оценить молярный коэффициент поглощения при 260 нм фталлоцианинового фрагмента в составе конъюгата, который оказался равным  $6.45 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ .

Способность полученного конъюгата образовывать дуплексы с комплементарными ДНК-последовательностями была проверена по плавлению комплекса конъюгата с олигонуклеотидом  $d(TGAATGGGAAGAGGGTCAGGTT)$  (подчеркнут участок связывания). Для сравнения были получены кривые плавления дуплекса с немодифицированным олигонуклеотидом  $pd(TCTTCCCA)$  (рис. 3). Оказалось, что при нагревании дуплекса с модифицированным олигонуклеотидом происходит коагуляция конъюгата в области 55–65°C, приводящая к рассеиванию света на всех длинах волн. Аналогичное поведение кривых плавления при 260 нм (область, где нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения) (кривая 1а) и при 300 нм (в этой области НК не поглощают свет) (1б) свидетельствует о нарушении гомогенности раствора в области высоких температур. Кроме того, изменения состояния раствора легко обнаруживаются под оптическим микроскопом, где видны окрашенные в синий цвет сферические структуры. Видимо, это связано со сборкой конъюгатов в стопочные структуры вследствие взаимодействия между собой остатков фталлоцианина за счет гидрофобных взаимодействий и/или образования  $\mu$ -оксокомплексов. Следует отметить, что кривая плавления комплекса, не содержащего остаток фталлоцианина (кривая 2), имела каноническую форму и воспроизводилась как при регистрации с повышением температуры, так и при отжиге. Это свидетельствует о существенном влиянии остатка тетракарбокситфаллоцианина на поведение комплексов при повышенных температурах.

Полученный конъюгат испытывался как реагент для модификации нуклеиновых кислот в реакциях сопряженного окисления молекулярным кислородом. Для этого исследовалась модификация 14- и 22-звенной ДНК-мишеней конъюгатом в составе соответствующих дуплексов (I) и (II). В качестве сопряженных восстановителей были использованы дитиотреит, 2-меркаптоэтанол, аскорбиновая кислота. Проводились эксперименты по модификации мишеней в присутствии  $H_2O_2$ .

Эксперименты по модификации ДНК в комплексе (I) проводили при 25°C. Продукты реакции анализировали гель-электрофорезом в 20% ПААГ.



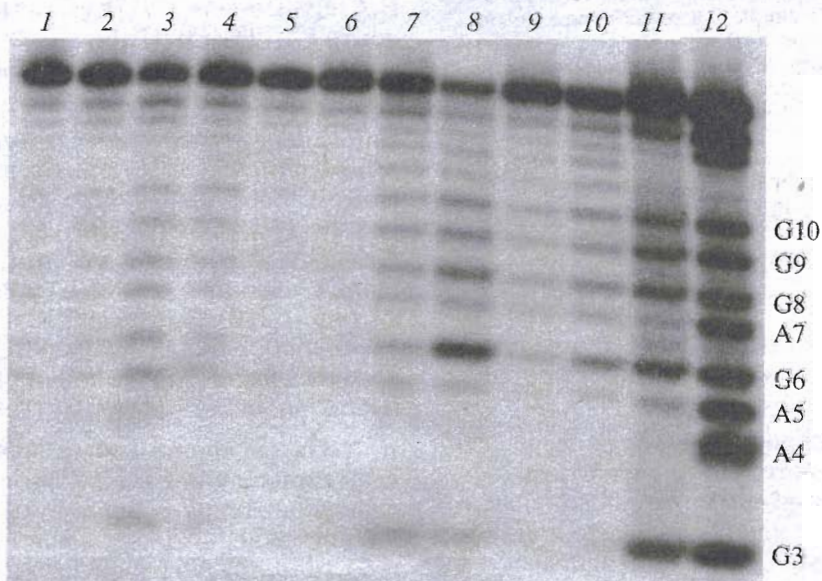


**Рис. 3.** Дифференциальные кривые термической денатурации дуплексов 22-звенной мишени с конъюгатом олигонуклеотида, содержащего остаток тетра-4-карбокситфаллоцианина (кривые 1а (260 нм) и 1б (300 нм)), и с олигонуклеотидом рd(TCTCCCA) (кривая 2 (260 нм)). Данные получены в буфере состава: 0.16 М NaCl, 0.02 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5), 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA при эквивальном соотношении цепей и общей их концентрации 4.11 мкМ.

Обнаружено, что прямые разрывы мишени отсутствуют. Модификация детектируется после обработки реакционной смеси в 1 М пиперидине. Как видно из представленного радиоавтографа (рис. 4),

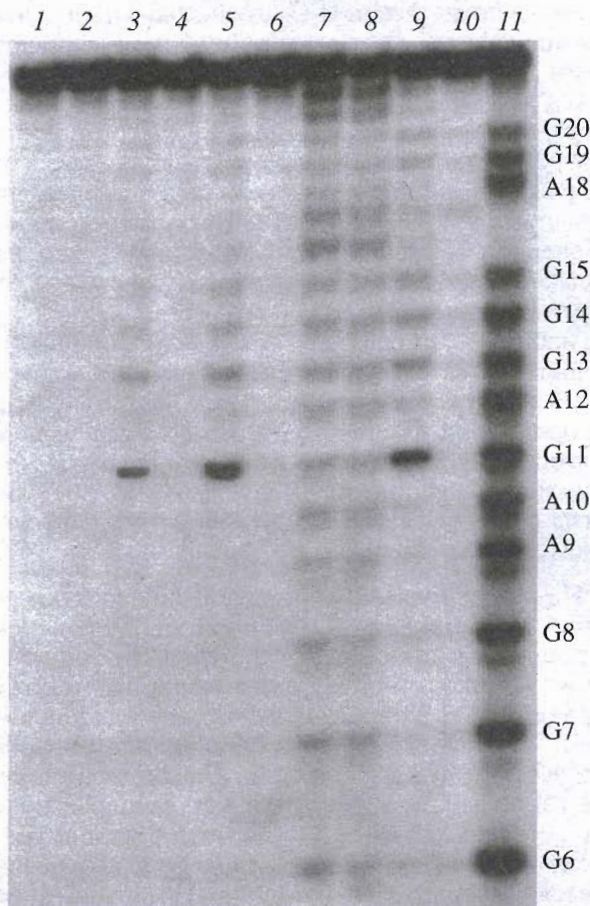
только в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> происходит направленная модификация по остатку G6 14-мера. В присутствии дитиотреита, 2-меркаптоэтанола и аскорбиновой кислоты имеет место лишь неселективная деградация мишени, усиливающаяся в присутствии реагента. Чтобы уменьшить вклад неспецифических реакций, проведены эксперименты при температуре 5°C в комплексе (II) с более длинной 22-звенной мишенью. Из рис. 5 видно, что при этом в присутствии дитиотреита (дорожки 3, 4), меркаптоэтанола (дорожки 5, 6) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (дорожки 9, 10) наблюдается специфическая модификация мишени по остатку G11, а неспецифическая модификация практически отсутствует. Однако в случае аскорбиновой кислоты по-прежнему не удалось достигнуть специфической модификации (дорожки 7, 8), вероятно, вследствие того, что она легче окисляется кислородом, чем другие восстановители.

На рис. 6 приведены кинетические кривые реакции модификации 22-звенной мишени в комплексе (II) в присутствии 2-меркаптоэтанола, а также в присутствии перекиси водорода при температуре 25°C. Предельная степень модификации для 2-меркаптоэтанола составила примерно 15%, а для H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – примерно 35%. Следует отметить, что такое невысокое значение предельных выходов реакции характерно для модификации ДНК производными металлокомплексов [17] и объясняется сложным многостадийным процессом образования радикалов. Видно, что время, за кото-

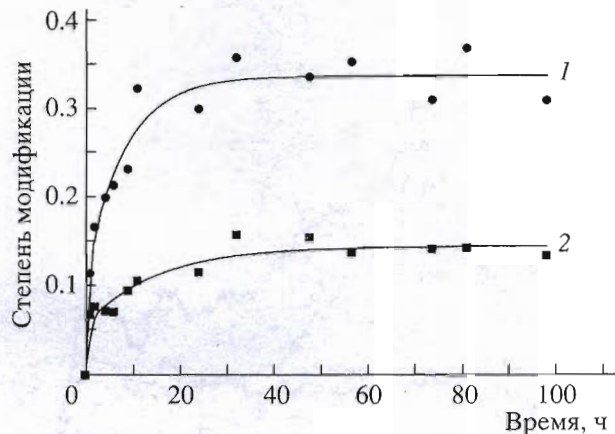


**Рис. 4.** Радиоавтограф, полученный при разделении в 20% денатурирующем ПААГ продуктов модификации конъюгатом 14-звенной олигонуклеотидной мишени в составе комплекса (I) при 25°C (24 ч) после пиперидиновой обработки. Концентрация мишени во всех дорожках –  $1.0 \times 10^{-8}$  М, конъюгата (дорожки 2, 7–10) –  $8.22 \times 10^{-5}$  М; концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (дорожки 4 и 8), 2-меркаптоэтанола (дорожки 6 и 10), дитиотреита (дорожки 5 и 9) или аскорбиновой кислоты (дорожки 3 и 7) –  $2.0 \times 10^{-4}$  М. Дорожки 11 и 12 – расщепленный по методу Максама-Гилберта по основаниям G и A + G, соответственно, 14-звенный олигонуклеотид-мишень.





**Рис. 5.** Радиоавтограф, полученный при разделении в 20% денатурирующем ПААГ продуктов модификации конъюгатом 22-звенной олигонуклеотидной мишени в составе комплекса (II) при 5°C (120 ч) после пиперидиновой обработки. Концентрация мишени во всех дорожках –  $1.0 \times 10^{-8}$  М, конъюгата (дорожки 2, 3, 5, 7, 9) –  $4.11 \times 10^{-5}$  М, концентрация  $H_2O_2$  (дорожки 9, 10), 2-меркаптоэтанола (дорожки 5, 6), дитиотреита (дорожки 3, 4) или аскорбиновой кислоты (дорожки 7, 8) –  $2.5 \times 10^{-4}$  М. Дорожка 11 – расщепленный по методу Максама–Гилберта по основаниям А + G 22-звенный олигонуклеотид-мишень.



**Рис. 6.** Кинетические кривые модификации 22-звенного олигонуклеотида-мишени конъюгатом в присутствии  $H_2O_2$  (1) и 2-меркаптоэтанола (2) в буфере состава: 0.16 М NaCl, 20 мМ  $NaH_2PO_4$ , 1 мМ  $Na_2EDTA$ , pH 7.5 при 25°C. Концентрация мишени  $1.0 \times 10^{-8}$  М, конъюгата  $8.22 \times 10^{-5}$  М, концентрация  $H_2O_2$  или 2-меркаптоэтанола  $2.0 \times 10^{-4}$  М.

(Fluka, Швейцария), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), 1,3-диаминопропан (Merck, Германия), Трис, 2-меркаптоэтанол, дитиотреит (Sigma, США). Все буферные растворы готовились на дважды дистиллированной воде с использованием отечественных реактивов марки “ос. ч”.

Тетра-4-карбокисфталоцианин Co(II) ( $\epsilon_{678} 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) был любезно предоставлен Е.А. Лукьянцем (Государственный научный центр РФ “НИОПИК”).

**Олигонуклеотиды** d(TGAATGGGAAGAGGGT-CAGGTT) и d(GGGAAGAGGGTTCAG) были синтезированы на автоматическом синтезаторе фирмы MilliGen/Bioscience, модель Cyclone Plus, с использованием фосфоамидитного метода. Олигонуклеотид pd(TCTTCCCA) синтезирован триэфирным блочным методом в растворе [24]. Продукты очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке ( $4.6 \times 250$  мм) Nucleosil  $NH_2$  (Macherey-Nagel, Германия) с последующей обращенно-фазовой хроматографией на колонке ( $4.6 \times 250$  мм) PRP-1 (Hamilton, Inc., США).

**N-Оксисукцинимидный эфир тетра-4-карбокисфталоцианина Co(II).** Раствор тетра-4-карбокисфталоцианина кобальта (19.2 мг, 27 мкмоль) в 2 мл сухого DMF добавляли в 1 мл раствора 18.7 мг (162 мкмоль) N-гидроксисукцинимида и 33.4 мг (162 мкмоль) DCC в DMF. Смесь встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 18 ч. Осадок дициклогексилмочевины отделяли центрифугированием и промывали DMF ( $3 \times 2$  мл). Раствор DMF объединяли и продукт высаживали постепенным добавлением сухого диэтилового эфира до соотношения DMF/эфир (1 : 10). Выпав-

рое модификация достигает своего предела, в обоих случаях одинаково и составляет приблизительно 20 ч.

Таким образом, в данной работе проведен синтез модифицированного олигонуклеотида, несущего по 5'-концевому фосфату тетракарбокисфталоцианин Co(II). Было установлено, что конъюгат обладает активностью в реакции направленной модификации ДНК-мишеней как в системе  $O_2$  + + восстановитель, так и в присутствии  $H_2O_2$ .

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, мочевины, ацетонитрил, DMF



ший продукт отделяли центрифугированием, затем процедуру переосаждения повторяли. Осадок высушивали в вакууме. Получили 17.8 мг (выход 60%) тетрасукцинимидного эфира тетракарбок-сифталоцианина Co(II).  $^1\text{H-NMR}$ -спектры полученного продукта регистрировались на приборе Bruker WP-200SY на частоте 200.13 МГц: (DMF- $d_7$ ,  $\delta$ , м.д.): 10.32 (м, 4H), 9.80 (м, 4H), 9.00 (м, 4H), 2.94 (с, 8H), 2.79 (с, 8H).

**Производное**  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-pd(TCTTCCSA)}$  синтезировали по методу, описанному в работе [22]. Для этого активировали 5'-концевую фосфатную группу смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии DMAP. Через 15 мин после прибавления реагентов олигонуклеотидный материал высаждали 10-кратным объемом диэтилового эфира, переосаждали 2%  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне из 3 М водного раствора  $\text{LiClO}_4$ , высушивали в вакууме и растворяли в 50 мкл 0.5 М водного раствора 1,3-диаминопропана. Через 30 мин продукт высаждали 2%  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне, высушивали и выделяли из реакционной смеси анионообменной хроматографией с последующим обессоливанием обращенно-фазовой хроматографией в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.05 М  $\text{LiClO}_4$  на хроматографе Waters 600E (Millipore, США).

**Синтез конъюгата тетракарбок-сифталоцианина Co(II) с олигонуклеотидом** проводили в смеси  $\text{H}_2\text{O/DMF}$  (1 : 1). Для этого 10 ОЕ $_{260}$  (150 нмоль) олигонуклеотидного производного  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-pd(TCTTCCSA)}$  растворяли в 50 мкл водного раствора, содержащего 0.05 М  $\text{NaHCO}_3$  и 0.05 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и добавляли двумя равными порциями с интервалом в 5 ч раствор 2 мг (1.5 мкмоль) *N*-оксисукцинимидного эфира тетра-4-карбок-сифталоцианина кобальта в 50 мкл DMF. Через 5 ч после добавления второй порции к раствору добавляли 100 мкл раствора 0.05 М  $\text{NaHCO}_3$  и 0.05 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и оставляли для полного гидролиза непрореагировавших сложноэфирных групп при 45°C на ночь. Олигонуклеотидный продукт отделяли от избытка свободного фталоцианина гелефильтрацией на колонке с сефадексом G-25, используя в качестве элюента 20% водный этанол. Фракцию, соответствующую по времени выхода олигонуклеотидному материалу, собирали и разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила в 0.05 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 7.15).

Для введения метки  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу олигонуклеотидов 30 мкл раствора 30 пмоль олигонуклеотида в буфере (рН 6.6), содержащем 0.05 М гидрохлорид имидазола, 0.01 М  $\text{MgCl}_2$ , 5 мМ дитиотреит, 0.1 мМ спермидин, 0.5 мМ ADP, 0.1 мМ EDTA, 30 пмоль  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (уд. акт.  $3.3 \times 10^{-3}$  мКи/пмоль), выдерживали 30 мин с 10–20 ед. акт. T4-полинуклеотид-

киназы (Сибэнзим, Россия) при 37°C. Реакционную смесь осаждали 10-кратным объемом 2%  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне. Меченый олигонуклеотид выделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ, радиоактивную полосу выявляли радиоавтографией. Из геля олигонуклеотид переносили электроэлюцией на бумажный фильтр DE-81, смывали нагретым до 56°C 3 М раствором  $\text{LiClO}_4$  и осаждали 2% раствором  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне. Осадок трижды промывали 200 мкл ацетона, высушивали в вакууме и растворяли в 100 мкл бидистиллята. Концентрация полученного раствора меченого олигонуклеотида не превышала  $2.5 \times 10^{-7}$  М.

**$^{32}\text{P}$ -меченый конъюгат** синтезировали по описанной выше методике с использованием в качестве исходного вещества  $^{32}\text{P}$ -меченый олигонуклеотид  $\text{pd(TCTTCCSA)}$ .

**Определение вклада остатка фталоцианина Co(II) в молярный коэффициент поглощения конъюгата** на длине волны 260 нм проводили следующим образом. Раствор 3 ОЕ $_{260}$   $^{32}\text{P}$ -меченого олигонуклеотида  $\text{pd(TCTTCCSA)}$  перед синтезом конъюгата разделяли на две части в соотношении 3 : 1. Большую часть раствора использовали в синтезе конъюгата, а от меньшей части отбирали аликвоты и измеряли их оптическое поглощение при длине волны 260 нм. После этого для этих аликвот, перенесенных на DEAE-бумагу, регистрировали радиоактивность (имп./мин) на сцинтилляционном счетчике 1112 Rackbeta (LKB, Швеция). Основываясь на значении молярного коэффициента поглощения олигонуклеотида, рассчитанном согласно работе [23] и равном  $\epsilon_{260} 6.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , строили калибровочную прямую для зависимости количества олигонуклеотида (моль) от радиоактивности (имп./мин). Для радиоактивно меченого конъюгата вышеописанным методом получали прямую, соответствующую поглощению раствора при 260 нм с радиоактивностью. Используя калибровочную прямую для свободного олигонуклеотида, переводили интенсивность радиоактивного распада в количество молей конъюгата, откуда рассчитывали молярный коэффициент поглощения для олигонуклеотидного конъюгата, оказавшийся равным  $\epsilon_{260} 1.32 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . После вычитания из этого значения молярного коэффициента поглощения олигонуклеотидной части ( $\epsilon_{260} 6.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [23]) получили вклад остатка фталоцианина, равный  $\epsilon_{260} 6.45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Модификацию** 14- и 22-звенного олигонуклеотидов-мишеней комплементарным олигонуклеотидом, несущим остаток тетракарбок-сифталоцианина Co(II), проводили в буфере состава: 0.16 М NaCl, 0.02 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 7.5), 1 мМ  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  при 25°C (24 ч) и при 5°C (120 ч). Концентрация олигонуклеотидов-мишеней в реакционной смеси со-



ставляла  $1.0 \times 10^{-8}$  М, концентрация конъюгата –  $8.22 \times 10^{-5}$  М, концентрации  $H_2O_2$ , 2-меркаптоэтанола, дитиотреита и аскорбиновой кислоты были равными  $2.0 \times 10^{-4}$  М. По истечении указанного времени к растворам добавляли 10-кратный избыток 2%  $LiClO_4$  в ацетоне. Осадки отделяли центрифугированием, дважды промывали 85% этанолом, затем ацетоном и высушивали в вакууме.

Для расщепления олигонуклеотидов по модифицированным пуринам осадок растворяли в 50 мкл 1 М пиперидина и выдерживали 45 мин при  $95^\circ C$  [25]. Затем осаждали и промывали как описано выше.

Перед нанесением на денатурирующий 20% ПААГ осадки растворяли в 5 мкл раствора 7 М мочевины, содержащего 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленианола FF. Электрофорез проводили при потенциале 50 В/см. Радиоавтографию геля на рентгеновскую пленку Agfa CP-BU (Agfa-Geavert, Бельгия) проводили в течение 10–20 ч при температуре  $-10^\circ C$ .

**Степень модификации** определяли, обрабатывая радиоавтограф, предварительно переведенный в цифровую форму в программном пакете Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, Inc., США). Величину степени модификации рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения степени модификации, как правило, не превышала 20%.

**Кривые термической денатурации** олигонуклеотидных комплексов регистрировали в буфере вышеуказанного состава при скорости нагрева  $0.5\text{--}0.9^\circ C$  в минуту при эквимольном соотношении цепей ДНК (общая их концентрация в растворе составляла  $4.11 \times 10^{-6}$  М). За изменениями оптического поглощения растворов комплексов при их нагревании в кювете объемом 2 мкл наблюдали при четырех различных длинах волн, используя оптический детектор хроматографа “Милихром” (ПО “Научприбор”, г. Орел), подключенный посредством АЦП к персональному компьютеру. Полученные данные обрабатывались с учетом коэффициента температурного расширения воды. Дифференциальные кривые получали из интегральных, рассчитывая прирост оптической плотности при возрастании температуры на  $1^\circ C$ .

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке научно-технической программы правительства Москвы, Миннауки и РАН “Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний”, подпрограммы “Новейшие методы биоинженерии” (проект “Ген-направленные биологически актив-

ные вещества”) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 98-04-48312 и № 99-04-48077). Авторы благодарят С.Г. Лохова и Д.В. Пышного за неоценимую помощь в выполнении экспериментов и обработке данных по плавлению ДНК-дуплексов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. // Tetr. Lett. 1967. V. 37. P. 3557–3562.
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, Florida; CRC Press, 1994.
3. Topics in Molecular and Structural Biology, V. 12. Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression / Ed. J.S. Cohen. London: Macmillan Press, 1989.
4. Uhlman E., Peumann A. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 543–584.
5. Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS / Ed. E. Wickström. N. Y.: Wiley-Liss. Inc., 1991.
6. Antisense Research and Application / Eds S.T. Crooke, B. Lebleu. N. Y.: CRC Press. Inc., 1993.
7. Kochevar I., Dunn D.A. // Bioorganic Photochemistry / Ed. H. Morrison. N. Y.: John Willey and Sons Inc., 1990. P. 273–315.
8. Fedorova O.S., Savitskii A.P., Shoikhet K.G., Ponomarev G.V. // FEBS Lett. 1990. V. 259. P. 335–337.
9. Le Doan T., Perrouault L., Helene C., Chassignol M., Thuong N.T. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 6736–6739.
10. Le Doan T., Perrouault L., Chassignol M., Thuong N.T., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 8643–8659.
11. Иванова Е.М., Мамаев С.В., Федорова О.С., Фролова Е.И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 551–554.
12. Mastruzzo L., Woisard A., Ma D.D.F., Rizzarelli E., Favre A., Le Doan T. // Photochem. Photobiol. 1994. V. 60. P. 316–322.
13. Boutorine A.S., Brault D., Takasugi M., Delgado O., Helene C. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 9469–9476.
14. Li H., Fedorova O.S., Trumble W.R., Fletcher T.R., Czuchajowski L. // Bioconjugate Chem. 1997. V. 8. P. 49–56.
15. Frolova E.I., Ivanova E.M., Zarytova V.F., Abramova T.V., Vlassov V.V. // FEBS Lett. 1990. V. 269. P. 101–104.
16. Casas C., Lasey C.J., Meunier B. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 366–371.
17. Frolova E.I., Fedorova O.S., Knorre D.G. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 5–12.
18. Mestre B., Pratviel G., Meunier B. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 466–472.
19. Magda D., Miller R.A., Sessler J.L., Iverson B.L. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 7439–7440.



20. Лукьянец Е.А. // Рос. хим. журн. 1998. Т. 42. С. 9–16.
21. Sinha D.N., Striepeke S. // *Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach* / Ed. F. Eckstein. Oxford; New York; Tokyo: Oxford University Press, 1991. P. 185–210.
22. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // *Биоорганич. химия*. 1986. Т. 12. С. 475–481.
23. Borer P.N. // *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids*. V. I / Ed. G.D. Fasman, 3rd ed. Cleveland: CRC Press. Inc., 1975. P. 589.
24. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Karpova G.G. // *Advances in Enzyme Regulation*. V. 24 / Ed. G. Weber. Oxford; New York; Toronto; Sydney; Frankfurt: Pergamon Press, 1985. P. 277–299.
25. Maxam A.M., Gilbert M. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499–560.

## The Synthesis of a Cobalt(II) Tetracarboxyphthalocyanine–Deoxyribooligonucleotide Conjugate as a Reagent for the Directed DNA Modification

V. V. Koval\*, A. A. Chernonosov\*\*, T. V. Abramova\*,  
T. M. Ivanova\*, O. S. Fedorova\*#, and D. G. Knorre\*

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

\*\*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

The cobalt(II) tetracarboxyphthalocyanine–deoxyribonucleotide pd(TCTTCCCA) conjugate was synthesized. The phthalocyanine *N*-succinimide ester prepared from phthalocyanine using DCC was mixed in DMF with an aqueous solution of the oligonucleotide bearing a 1,3-diaminopropane linker at the 5'-phosphate. The resulting conjugate was tested in the intraduplex reaction with target 14-mer and 22-mer oligonucleotides containing conjugate-complementary sequences. In the presence of O<sub>2</sub> and a thiol (2-mercaptoethanol or DTT) as a coupled reducer or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sequence-specific DNA modification was observed that caused the cleavage of the target upon treatment with piperidine.

*Key words:* DNA modification, oligonucleotide, phthalocyanine

# To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 34-4274; fax: +7 (3832) 33-3677;  
e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 2. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.