



УДК 547.963.3:577.113.6

## СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК БИНАРНЫМИ СИСТЕМАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЬЮГАТОВ. VI. ВЛИЯНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В АНТРАЦЕНОВОМ ОСТАТКЕ СЕНСИБИЛИЗАТОРА

© 2000 г. М. И. Добриков, Т. И. Гайнутдинов<sup>#</sup>, Т. М. Иванова, В. В. Власов

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

Поступила в редакцию 09.02.2000 г. Принята к печати 06.03.2000 г.

Изучена фотомодификация одноцепочечной ДНК бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов, комплементарных соседним участкам ДНК. Один из конъюгатов содержал сенсibilизатор – замещенный антрацен, второй – фотореагент – 3-аминопропионилгидразон *n*-азидотетрафторбензальдегида. Сенсibilизированная фотомодификация инициируется светом 365–580 нм за счет эффективного переноса энергии с фотовозбужденного сенсibilизатора на фотореагент в комплементарном комплексе бинарной системы с ДНК-мишенью, в котором сенсibilизатор и фотореагент стерически сближены. Рассмотрено влияние заместителей в антраценовом ядре на эффективность сенсibilизированной фотомодификации ДНК. Олигонуклеотидный конъюгат 3-аминопропионилгидразона 9-антраценаля позволяет высокоспецифично инициировать сенсibilизированную фотомодификацию при облучении видимым светом с длиной волны >460 нм, в условиях, когда в отсутствие сенсibilизатора фотореакция не наблюдается.

*Ключевые слова:* антисмысловые олигонуклеотиды; фотомодификация ДНК; перенос энергии; сенсibilизация.

### ВВЕДЕНИЕ

Фотореакционноспособные олигонуклеотидные конъюгаты считаются перспективными инструментами для исследования структуры и функции биополимеров [2], рассматриваются в качестве противоопухолевых препаратов и реагентов для селективного подавления экспрессии генов [3]. Это обусловлено тем, что фотореагенты, как правило, нетоксичны и химически инертны в темноте, процесс их активации легко регулировать во времени. Многие фотореагенты при облучении видимым [4] и даже ИК-светом [5, 6] генерируют высокорекционноспособные частицы, способные ковалентно присоединяться к нуклеиновым кислотам или расщеплять их. Наиболее полное сведения о фотореагентах, используемых для фотомодификации нуклеиновых кислот, представлены в обзорах [2, 3, 7, 8].

Однако для большинства фотореагентов поглощение света и темновые реакции протекают и в комплементарном комплексе с ДНК-мишенью,

и в растворе с одинаковыми скоростями. В лучшем случае это приводит к непродуктивному расходу фотореагента в растворе, а чаще всего инициирует нежелательные побочные реакции [8]. Чтобы преодолеть этот недостаток, ранее были предложены бинарные системы олигонуклеотидных конъюгатов, комплементарных соседним участкам ДНК-мишени и несущих химически инертные группы – сенсibilизатор и фотореагент [1, 9–16]. Сближенные в составе комплементарного комплекса группы образуют фотореакционноспособный центр, который можно активировать облучением длинноволновым УФ- или видимым светом. Активированный фотореагент вызывает фотомодификацию только той ДНК-мишени, которая находится в составе комплементарного комплекса.

Ранее было изучено влияние на эффективность фотомодификации таких факторов, как длина линкера [13], состав ДНК-мишени в сайте модификации [16], строение фотореагента [17] и способ присоединения фотореагента к гетероциклическому основанию, 3'- или 5'-концевому фосфату [17].

В данной работе изучено влияние заместителей в антраценовом остатке сенсibilизатора на эффективность фотомодификации ДНК-мишени.

Сообщение V см. [1].

Префикс “d” в обозначениях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (383-2) 39-62-29; факс: (383-2) 33-36-77; e-mail: timurg@niboch.nsc.ru).

Максимумы поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$ ) и флуоресценции ( $\lambda_{\text{fl}}$ ) антрацена и его производных (I)–(IV), эффективная константа гашения ( $K_{\text{эфф}}$ ) их флуоресценции 3-аминопропионилгидразоном *n*-азидотетрафторбензальдегида (RH) и относительная интенсивность флуоресценции ( $F_{\text{отн}}$ )

Соединение	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	$\lambda_{\text{fl}}$ , нм	$K_{\text{эфф}}$ , $\text{M}^{-1}$	$F_{\text{отн}}$
Антрацен	377	400	2500	1.0
(I)	384	415	700	1.2
(II)	392	425	350	2.0
(III)	387	465	200	0.02
(IV)	398	475	70	0.01

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способ получения и структурные формулы использованных производных антрацена представлены на схеме 1.

Синтез 9-аминометилантрацена (I) и 9-хлор-10-аминометилантрацена (II) проводили обработкой соответствующих антраляльдегидов гидроксиламином с последующим каталитическим восстановлением альдоксимной группировки водородом. Выход соединений (I) и (II) составлял около 30% в расчете на двухстадийный синтез. 3-Аминопропионилгидразон 9-антрацена (III) и 3-аминопропионилгидразон 9-хлор-10-антрацена (IV) получали обработкой соответствующих антраляльдегидов гидразидом  $\beta$ -аланина, синтез которого описан ранее [18]. Строение синтезированных соединений доказано физико-химическими методами.

Были изучены спектрально-люминесцентные свойства производных антрацена (I)–(IV) (таблица). Введение аминотетильной или 3-аминопропионилгидразоновой группы в антраценовое ядро (производные (I) и (III)) вызывает длинноволновый сдвиг максимума поглощения соответствен-

но на 7 и 10 нм, после введения атома Cl (производные (II) и (IV)) наблюдается дополнительный батохромный сдвиг на 8–11 нм. Наличие атома хлора и аминотетильной группы приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, в то время как наличие гидразоногруппы практически на два порядка снижает ее интенсивность. Стоксов сдвиг (разница между максимумами флуоресценции и поглощения) для аминотетильных производных составляет 31–33 нм, а для гидразонопроизводных – 77–78 нм. Эти данные показывают, что для аминотетильных производных (I), (II) безызлучательные потери энергии в фотовозбужденном состоянии меньше, чем для гидразонопроизводных (III), (IV).

Методом гашения флуоресценции антрацена и его производных (I)–(IV) 3-аминопропионилгидразоном *n*-азидотетрафторбензальдегида (RH) были оценены значения эффективных констант переноса энергии ( $K_{\text{эфф}}$ ) (см. таблицу). Видно, что значения констант падают при увеличении длины волны максимума флуоресценции ( $\lambda_{\text{fl}}$ ). Присоединение производных антрацена к олигонуклеотиду приводит к батохромному сдвигу максимумов поглощения сенсibilизаторов на 5–10 нм.

В качестве ДНК-мишени был использован синтетический 25-звенный дезоксирибоолигонуклеотид (V), соответствующий фрагменту последовательности мРНК человеческого гена множественной лекарственной устойчивости. Строение ДНК-мишени, олигонуклеотидных конъюгатов, сенсibilизаторов (SH) и фотореагента 3-аминопропионилгидразона *n*-азидотетрафторбензальдегида (RH) представлено на схеме 2.

Для оценки влияния заместителей в 9-м и 10-м положениях остатка антрацена на эффективность переноса энергии было изучено накопление ковалентных аддуктов модификации в ходе сенсibilизированной и прямой фотомодификации (рис. 1). Облучение проводилось в том диапазоне длин волн (380–420 нм), где располагаются максимумы поглощения олигонуклеотидных конъюгатов (VII)–(X).

Видно, что накопление ковалентных аддуктов и начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации увеличиваются в ряду конъюгатов (X) < (IX) < (VII) < (VIII), достигая для последних двух 98–99% (рис. 1, дор. 5, 9). В целом, этот результат качественно согласуется с относительной эффективностью флуоресценции ( $F_{\text{отн}}$ ) исходных производных антрацена (I)–(IV) (см. таблицу). Низкая эффективность сенсibilизации фотомодификации конъюгатом (X) может быть обусловлена тем, что у этого соединения энергии возбужденного состояния недостаточно для активации азидогруппы.

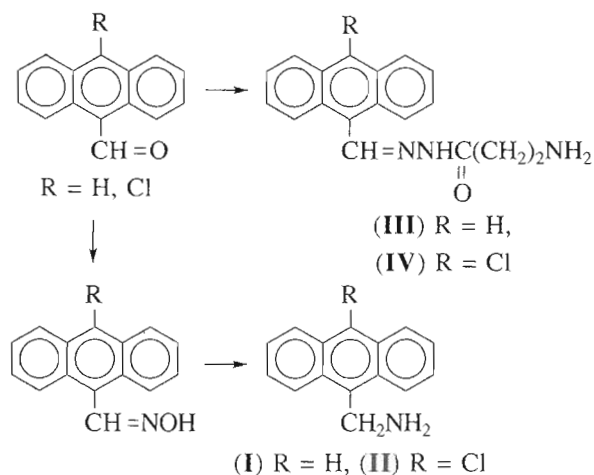


Схема 1.

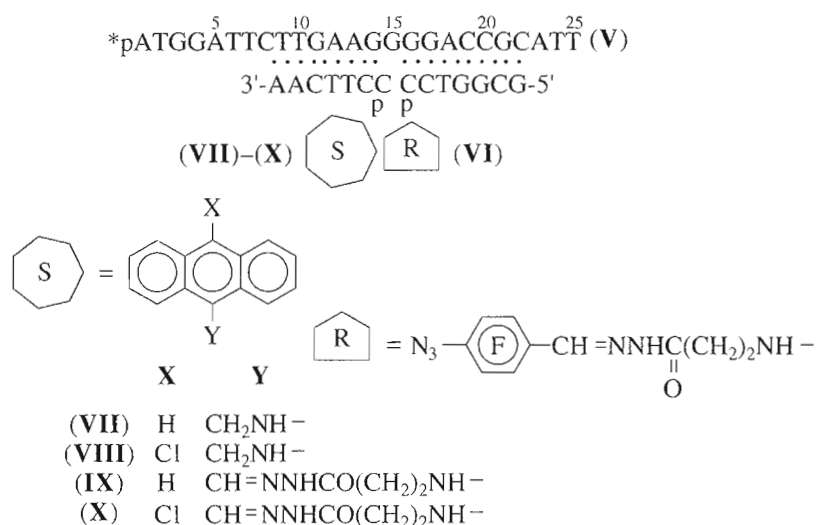


Схема 2.

Следовательно, с точки зрения начальной скорости и предельной степени фотомодификации, при облучении в максимуме поглощения наиболее перспективным сенсibilизатором является конъюгат 9-хлор-10-аминометилантрацена (VIII).

Несколько иная картина наблюдается при облучении видимым светом в диапазоне длин волн 420–580 нм (рис. 2). Начальная скорость накопления ковалентных аддуктов фотомодификации ДНК-мишени увеличивается в ряду: (VII) < (VIII) < (X) < (IX). Предельная степень модификации для фотореакции, сенсibilизированной олигонуклеотидным производным 3-аминопропионилгидразона 9-антраценаля (IX), также выше, чем для остальных конъюгатов.

Еще заметнее становятся преимущества соединения (IX) как сенсibilизатора при облуче-

нии более длинноволновым видимым светом (>460 нм). При этом наблюдается только фотомодификация, сенсibilизированная олигонуклеотидным конъюгатом (IX), в то время, как ни прямая, ни сенсibilизированная производными (VII) и (VIII) реакции в этих условиях не протекают. По-видимому, это обусловлено тем, что введение гидразоногруппы в антраценовое ядро приводит к расширению полосы поглощения антраценового производного (III) ( $\lambda_{\text{max}}$  387 нм) в видимую область, что позволяет сенсibilизировать фотомодификацию при облучении видимым светом с длиной волны >460 нм.

Следовательно, конъюгат (IX) позволяет высокоспецифично проводить сенсibilизированную фотомодификацию в условиях, когда в отсутст-

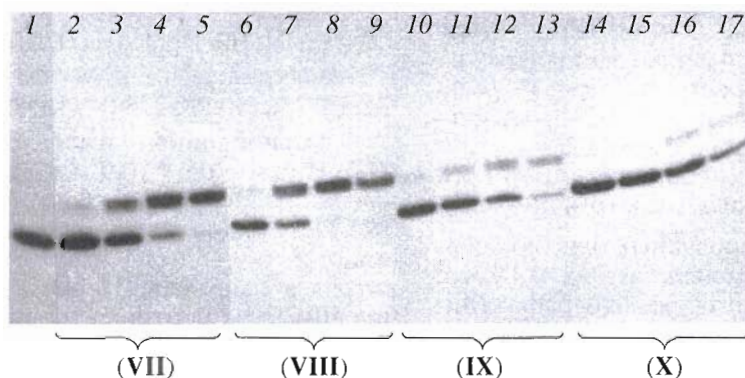
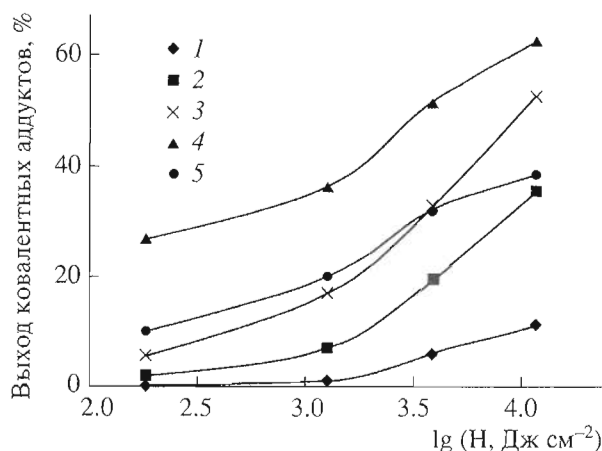


Рис. 1. Радиоавтограф геля, полученный после электрофоретического разделения продуктов фотомодификации  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченой мишени (V) в присутствии фотореагента (VI), сенсibilизированной конъюгатами (VII) – 2–5, (VIII) – 6–9, (IX) – 10–13, (X) – 14–17, при облучении светом (380–420 нм). 1 – исходная ДНК-мишень (V). Концентрации, мкМ: ДНК-мишень (V) – 1, фотореагент (VI) и сенсibilизаторы (VII)–(X) – 50; 25°C. Время облучения, мин: 0.2 – 2, 6, 10, 14; 2 – 3, 7, 11, 15; 20 – 4, 8, 12, 16; 200 – 1, 5, 9, 13, 17.



**Рис. 2.** Зависимость выхода ковалентных аддуктов сшивки ДНК-мишени (V) с олигонуклеотидным производным (VI) при прямой (I) и сенсibilизированной олигонуклеотидными производными (VII)–(X) (2, 3, 4 и 5 соответственно) фотомодификации от экспозиции (H, полулогарифмические координаты). Условия облучения: светофильтры СЗС-23, ЖС-11 (420–580 нм), расстояние 8 см, W 8 мВт/см<sup>2</sup>.

вие этого сенсibilизатора фотореагент практически инертен.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 9-формилантрацен (Рехим, “ч. д. а.”), 9-хлор-10-формилантрацен (Merck, Германия), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (Биосан, Новосибирск), Т4-полинуклеотидкиназу (Сибэнзим, Новосибирск).

ИК-спектры снимали на приборе UR-20 в таблетках КВг. Запись УФ-спектров и измерение оптического поглощения растворов проводили на спектрофотометрах UV-2100 (Shimadzu, Япония) и Spexord M40 (Carl Zeiss Jena, Германия). Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали на приборе Bruker-200A, внутренний стандарт – гексаметилендисилоксан. Температуру плавления определяли в запаянных капиллярах на установке “Кристалл”, скорость нагрева 0.3°C/мин. Хроматографическая система для ТСХ: бензол-метанол, насыщенный аммиаком, 98 : 2; пластинки: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия), пятна обнаруживали при облучении УФ-светом.

Для выделения синтезированных олигонуклеотидных производных применяли метод ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа “Милихром” отечественного производства, колонка Nucleosil C-18, 5–20 мкм (60 × 2 мм) (Merck, Германия), ступенчатый градиент концентрации ацетонитрила в 0.05 М LiClO<sub>4</sub> (ступени по 400 мкл: 0–20–40–60%), скорость элюции 100 мкл/мин.

Значения молярных коэффициентов поглощения ( $\epsilon_{260}$ ) олигонуклеотидов рассчитывали с

помощью компьютерной программы Oligos, использующей динуклеотидный метод [19].

Интенсивность падающего на образцы света определяли с помощью люксметра Ю-117 [20].

**9-Аминометилантрацен, гидрохлорид (I)** был получен из 0.55 г 9-формилантрацена, как описано ранее [1]. Выход 0.21 г (38%), т. пл. 270–272°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ , м.д., J, Гц): 8.64 (с, 1H, H10), 8.37 (д, 2H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>8,7</sub> = 9, H1, H8), 8.13 (дд, 2H, J<sub>3,4</sub> = J<sub>5,6</sub> = 9, J<sub>2,4</sub> = J<sub>5,7</sub> = 3, H4, H5), 7.71 (дт, 2H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>7,8</sub> = 9, J<sub>2,4</sub> = J<sub>7,5</sub> = 1.5, H2, H7), 7.58 (дт, 2H, J<sub>3,2</sub> = J<sub>6,7</sub> = 9, J<sub>1,3</sub> = J<sub>4,6</sub> = 1.5, H3, H6), 5.17 (с, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-N). УФ-спектр ( $\lambda_{\max}$ , нм,  $\epsilon$ , М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): 255 (150000), 332 (3000), 348 (6000), 365 (8500), 384 (7700).

**9-Хлор-10-антраценальдоксим** получали из 9-хлор-10-формилантрацена по методу [21]. Раствор 4 г (18 ммоль) 9-хлор-10-формилантрацена в 24 мл диоксиана добавили к раствору 1.6 г (24.8 ммоль) хлоргидрата гидроксиламина и 1.55 г (11.4 ммоль) тригидрата ацетата натрия в 8 мл воды. Через 1 ч реакционную смесь вылили в 100 мл воды, осадок отфильтровали, промыли водой и высушили. Выход 95%, R<sub>f</sub> 0.5. <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>,  $\delta$ , м.д., J, Гц): 11.89 (с, 1H, =NOH), 9.15 (с, 1H, N=CHAr), 8.44 (дд, 4H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>3,4</sub> = J<sub>5,6</sub> = J<sub>8,7</sub> = 6, J<sub>1,3</sub> = J<sub>2,4</sub> = J<sub>5,7</sub> = J<sub>6,8</sub> = 1.5, H1, H4, H5, H8), 7.69 (дд, 4H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>2,3</sub> = J<sub>3,4</sub> = J<sub>5,6</sub> = J<sub>7,8</sub> = 6, J<sub>1,3</sub> = J<sub>2,4</sub> = J<sub>5,7</sub> = J<sub>6,8</sub> = 1.5, H2, H3, H6, H7).

**9-Хлор-10-аминометилантрацен, гидрохлорид (II)**. В 15 мл 2 М HCl в метаноле суспендировали 0.5 г (2.25 ммоль) 9-хлор-10-антраценальдоксима и 0.1 г Pd-черни в атмосфере водорода при интенсивном перемешивании в течение 2 ч. Смесь отфильтровали от катализатора, который затем дважды промывали метанолом. Растворы объединяли, упаривали до объема 2–3 мл, и продукт осаждали 30 мл диэтилового эфира. Осадок растворяли в метаноле и четыре раза повторяли переосаждение эфиром. Выход 0.21 г (38%), т. пл. 270–272°C, R<sub>f</sub> 0.1. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ , м.д., J, Гц): 8.7 (уш. с, 3H, –NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.55 (м, 4H, H1, H4, H5, H8), 7.75 (м, 4H, H2, H3, H6, H7), 5.07 (с, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-N). УФ-спектр ( $\lambda_{\max}$ , нм,  $\epsilon$ , М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): 254 (160000), 340 (2200), 356 (5000), 375 (8200), 392 (8000).

**3-Аминопропионилгидразон 9-антраценаля (III)**. Раствор 0.2 г (0.9 ммоль) 9-хлор-10-формилантрацена в 6 мл диоксиана добавили к раствору 0.25 г (1.4 ммоль) дихлоргидрата гидразида  $\beta$ -аланина [18] и 0.15 г (1.1 ммоль) тригидрата ацетата натрия в 2 мл воды. Через 1.5 ч перемешивания при 50°C осадок отфильтровали, промыли водой, высушили и перекристаллизовали из метанола. Выход 62%, R<sub>f</sub> 0.1, т. пл. >250°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>,  $\delta$ , м.д., J, Гц): 9.47, 9.28 (2с, 1H, N=CHAr), 8.71 (с, 1H, H10), 8.65 (дд, 2H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>7,8</sub> = 8, J<sub>1,3</sub> = J<sub>6,8</sub> = 2, H1, H8), 8.19 (дд, 2H, J<sub>3,4</sub> = J<sub>5,6</sub> = 8, J<sub>2,4</sub> = J<sub>5,7</sub> = 2, H4, H5), 7.63 (м, 4H, H2, H3, H6, H7), 2.16 (м, 4H, –CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>):

2950, 2850 ( $-\text{CH}_2-$ ), 1770 ( $\text{O}=\text{CN}-$ ), 1400 ( $\text{ArCH}=\text{N}-$ ). УФ-спектр ( $\lambda_{\text{max}}$ , нм,  $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 254 (128000), 368 (7100), 387 (7000).

**3-Аминопропионилгидразон 9-хлор-10-антраценаля (IV)** получали из 9-хлор-10-формилантрацена аналогично соединению (III). Выход 82%,  $R_f$  0.1, т. пл.  $>250^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $\delta$ , м.д.,  $J$ , Гц): 9.43, 9.21 (2с, 1H,  $\text{N}=\text{CHAr}$ ), 8.55 (дд, 4H,  $J_{1,2} = J_{3,4} = J_{5,6} = J_{7,8} = 8$ ,  $J_{1,3} = J_{2,4} = J_{5,7} = J_{6,8} = 2$ , H1, H4, H5, H8), 7.77 (м, 4H, H2, H3, H6, H7), 3.06 (м, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ). ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2950, 2850 ( $-\text{CH}_2-$ ), 1770 ( $\text{O}=\text{CN}-$ ), 1400 ( $\text{ArCH}=\text{N}-$ ). УФ-спектр ( $\lambda_{\text{max}}$ , нм,  $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 223 (16500), 258 (98000), 359 (4500), 377 (7400), 398 (7800).

**Определение эффективной константы гашения флуоресценции ( $K_{\text{эфф}}$ )** проводили как описано в работе [12]. Был использован 3-аминопропионилгидразон *n*-азидотетрафторбензальдегида (RH). Длина волны возбуждения  $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{max}} \pm 6$  нм; длина волны эмиссии  $\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{fl}} \pm 6$  нм.

**ДНК-мишень (V)** и олигонуклеотиды-“адреса”, содержащие 5'-( $\rho\text{CCTTCAA}$ ) и 3'-( $\text{GCGGTC-Sp}$ ) концевые фосфаты, были синтезированы *H*-фосфонатным методом на автоматическом синтезаторе [22] в Новосибирском институте биоорганической химии. Вычисленное значение молярного коэффициента поглощения олигонуклеотида (V)  $\epsilon_{260} 244400 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

**$^{32}\text{P}$ -метку по 5'-концу олигонуклеотида-мишени** вводили по методике, описанной в [23], меченый олигонуклеотид очищали с помощью электрофореза согласно [24].

**Олигонуклеотидный конъюгат (VI).** К 50 мкл водного раствора олигонуклеотида (100–200  $\text{OE}_{260}/\text{мл}$ ), содержащего 3'-концевую фосфатную группу, добавили 8% водный раствор бромида цетилтриметиламмония (цетавлона) из расчета 1 мкл на 1  $\text{OE}_{260}$  олигонуклеотида и центрифугировали 1 мин на микроцентрифуге. Осадок цетавлоновой соли олигонуклеотида промыли эфиром и сушили 15 мин в вакуумном эксикаторе, затем растворили в 50 мкл абсолютного DMSO и добавили 1.7 мг 2,2'-дипиридилдисульфида и 2.0 мг трифенилфосфина. Через 10 мин к смеси добавили 1 мг 4-*N,N*-диметиламинопиридина, выдержали 10 мин и осадили олигонуклеотидное производное добавлением 1 мл эфира. Осадок диметиламинопиридиниевого производного олигонуклеотида дважды промыли эфиром. Сушили в вакуумном эксикаторе 10 мин и растворили в 50 мкл абсолютного DMSO, содержавшего 2 мг диметиламинопиридина и 2 мкмоль фотореагента RH (см. схему 2). Реакционную смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Конъюгат осадили 10-кратным объемом 2% раствора  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне. Осадок растворили в 50 мкл воды и выделяли перфторарилазидное производное олигонуклеотида ВЭЖХ.

Выход конъюгата (VI) 70–80%, время удерживания (ВЭЖХ) – 6.9 мин, УФ-спектр ( $\lambda_{\text{max}}$ , нм,  $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 258 (66000), 309 (30000) – принимая, что в конъюгате соотношение олигонуклеотид/фотореагент составляет 1 : 1.

**Олигонуклеотидные производные (VII), (VIII), (IX) и (X)** синтезировали из 5–10  $\text{OE}_{260}$  олигонуклеотида, содержащего 5'-концевую фосфатную группу, по методике, описанной для производного (VI), за исключением стадии осаждения реакционной смеси после инкубации с 4-*N,N*-диметиламинопиридином. На этой стадии в реакционную смесь добавили 10 мкл абсолютного DMSO, содержавшего 2 мкмоль сенсibilизатора SH (см. схему 2). Реакционную смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Далее конъюгат осаждали и выделяли аналогично конъюгату (VI).

Выход конъюгатов (VII), (VIII), (IX) и (X) составлял 75–80%, время удерживания (ВЭЖХ) – от 7 до 7.5 мин. Спектральные свойства конъюгата (VII) описаны ранее [1]. Спектры поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$ , нм,  $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): (VIII) – 255 (12000), 381 (8000), 403 (7500); (IX) – 256 (15000), 375 (6000), 392 (7500); (X) – 260 (155000), 384 (6000), 404 (8000) – принимая, что во всех случаях в конъюгатах соотношение олигонуклеотид/сенсibilизатор составляет 1 : 1.

**Фотомодификация ДНК-мишени.** 10–15 мкл реакционной смеси, содержащей 0.1–1 мкМ раствор ДНК-мишени (V) и 0.1–50 мкМ растворы олигонуклеотидных производных фотореагента (VI) и сенсibilизатора (VII)–(X) в 6 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (рН 7.6), 0.2 М  $\text{NaCl}$  и 0.02 мМ EDTA, помещали в цилиндрические лунки иммунологических планшетов диаметром 4 мм, закрывали крышками, термостатировали при  $25^\circ\text{C}$  и облучали конденсированным светом ртутной лампы ДРК-120 осветителя ОИ-18А (ЛОМО, Санкт-Петербург) через следующие наборы стеклянных светофильтров ( $\lambda$ , нм;  $W$ , мВт  $\text{cm}^{-2}$ ): БС-8, ПС-13 (380–420; 0.2); ЖС-11, СЗС-23 (420–580; 8); ЖС-12, ЖС-12 ( $>460$ ).

Уменьшение объема раствора образцов, связанное с испарением, не превышало 20%. После облучения из реакционной смеси отбирали аликвоты по 2 мкл, смешивали с 2 мкл раствора 80% формамида, содержащего 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленцианола FF, и анализировали методом электрофореза в 20% ПААГ (0.05 М Трис-боратный буфер, рН 7.4, 7 М мочевины).

Экспонирование геля на рентгеновской пленке Agfa CP-BU с усиливающим экраном проводили в течение 8–24 ч при  $-20^\circ\text{C}$ . Радиоавтографы гелей сканировали на лазерном денситометре 2222 Ultroskan-XL (LKB, Швеция). Степень модификации и выход продуктов расщепления по основаниям ДНК-мишени рассчитывали как отношение площадей пиков аддуктов и продуктов к сумме площадей пиков всех продуктов и пика исходной ДНК. Ошибка определения степени модификации, как правило, не превышала 10%.

Настоящая работа финансировалась грантом СО РАН в поддержку междисциплинарных проектов и грантом INTAS-RFBR № 95-0653.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Иванова Т.И., Власов В.В. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 137–146.
2. Каневский И.Э., Кузнецова С.А. // Успехи химии. 1998. Т. 63. С. 688–704.
3. 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.
4. Li H., Fedorova O.S., Trumble W.R., Fletcher T.R., Czuchajowsky L. // Bioconjugate Chem. 1997. V. 8. P. 49–56.
5. Magda D., Miller R.A., Wright M., Rao J., Sessler J.L., Iverson B.L., Samson P.I. // DNA and RNA Cleavers and Chemotherapy of Cancer and Viral Diseases / Ed. B. Meunier. NATO ASI Series; Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1996. V. 479. P. 337–354.
6. Fisher W.G., Partridge W.P., Dees C., Wachter E.A. // Photochem. Photobiol. 1997. V. 66. P. 141–155.
7. Armitage B. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1171–1200.
8. Добриков М.И. // Успехи химии. 1999. Т. 68. С. 1062–1079.
9. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 553–560.
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. 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., 1996. V. 479. P. 195–210.
12. 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.
13. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 191–199.
14. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 358. С. 403–407.
15. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 31–39.
16. Dobrikov M.I., Gainutdinov T.I., Vlassov V.V. // Nucleosides Nucleotides. 1999. V. 18. P. 1517–1518.
17. Levina A.S., Tabatadze D.R., Dobrikov M.I., Shishkin G.V., Khalimskaya L.M., Zarytova V.F. // Antisense Nucl. Acid Drug. Develop. 1996. V. 6. P. 119–126.
18. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 191–199.
19. Cantor C.R., Tinoko J. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–77.
20. Соколов М.В. Прикладная биофотометрия. М.: Наука, 1982. С. 79–116.
21. Kenneth W.B., Tuttle R.L., Knick V.C., Cory M., McKee D.D. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 2385–2393.
22. Веняминаева А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.
23. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook I. Molecular Cloning. Gold Spring Harbor, New York; Gold Spring Harbor Lab. Press, 1982. P. 125.
24. Ямищиков В.Ф. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Ред. Р.И. Салганик. М.: Наука, 1990. С. 112–114.

## Sensitized Site-specific Photomodification of ssDNA by Binary Systems of Oligonucleotide Conjugates.

### VI. Effect of Substituents in the Sensitizer Anthracene Residue

M. I. Dobrikov, T. I. Gainutdinov<sup>#</sup>, T. M. Ivanova, and V. V. Vlassov

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

Photomodification of ssDNA by binary systems of oligonucleotide conjugates complementary to the adjacent sequences of the target DNA was studied. One of the conjugates comprised a substituted anthracene as a sensitizer; the other, *p*-azidotetrafluorobenzaldehyde 3-aminopropionylhydrazone as a photoreagent. The sensitized photomodification is initiated by the 365–580-nm light through an efficient energy transfer from the photoexcited sensitizer onto the photoreagent in a complementary complex of the binary system with the DNA target where the sensitizer and the photoreagent are sterically converged. Influence of substituents in the anthracene residue on the efficiency of the DNA sensitized photomodification was considered. The oligonucleotide conjugate of anthracene-9-al 3-aminopropionylhydrazone allows highly specific initiation of the sensitized photomodification upon irradiation with visible light at >460 nm in conditions generating no photoreaction in the sensitizer's absence.

*Key words:* antisense oligonucleotides, energy transfer, perfluoroarylazides, sensitized DNA photomodification

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (383-2) 396229; fax: +7 (383-2) 333677; e-mail: timurg@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.