

# Сайт-специфическая фотосенсиблизированная модификация нуклеиновых кислот бирадикальными и электрофильными реагентами

М.И.Добриков

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Российской академии наук  
630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8, факс (383) 233–3676

Рассмотрены фотосенсиблизированные реакции химической модификации нуклеиновых кислот, не требующие участия кислорода, в том числе реакции свободнорадикального циклоприсоединения и электрофильного присоединения (фотодинамический эффект III типа). Основное внимание уделено сайт-специфической фотомодификации. Описаны новые подходы к высокоспецифической афинной модификации нуклеиновых кислот — сенсиблизированная фотомодификация бинарными системами фотореагент–сенсибилизатор и двухквантовые фотосенсиблизированные реакции. Обсуждены перспективы использования электрофильных фотореагентов для модификации нуклеиновых кислот *in vivo*.  
Библиография — 119 ссылок.

## Оглавление

|                                                                                                            |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| I. Введение                                                                                                | 1062 |
| II. Фотореакции свободнорадикального циклоприсоединения и электрофильного присоединения нуклеиновых кислот | 1063 |
| III. Сенсиблизированная фотомодификация ДНК бинарными системами                                            | 1070 |
| IV. Двухквантовая фотосенсиблизированная модификация ДНК                                                   | 1074 |
| V. Перспективы использования фотореагентов для направленной модификации нуклеиновых кислот <i>in vivo</i>  | 1077 |

## I. Введение

Разработка методов направленной химической модификации нуклеиновых кислот (НК) по определенным нуклеотидным последовательностям имеет важное значение для изучения клеточных процессов, связанных с экспрессией генов,<sup>1,2</sup> для создания ген-направленных биологически активных веществ<sup>3</sup> и для развития новых технологий, основанных на использовании олигонуклеотидных чипов и микроэлементов для ЭВМ будущих поколений.<sup>4</sup>

Направленная модификация НК осуществляется с помощью аффинных реагентов, способных специфично связываться с определенными нуклеотидными последовательностями и содержащих реакционноспособные группы, вызывающие модификацию НК при связывании. Для узнавания определенных нуклеотидных последовательностей используют фрагменты антибиотиков,<sup>5,6</sup> олигонуклеотиды<sup>3,7,8</sup> и их производные.<sup>2,9</sup> В качестве аффинных реагентов применяют соединения, генерирующие свободные радикалы,<sup>3,10</sup> алкилирующие реагенты<sup>3,8</sup> и фотореакционноспособные соединения.<sup>2,3,7,11</sup>

Химически активные производные олигонуклеотидов могут реагировать с различными компонентами клетки.

Это приводит к нежелательной токсичности и расходу реагента в побочных реакциях. Значительными преимуществами обладают фотореакционноспособные производные: они нетоксичны в темноте, активируются светом, процесс фотоактивации легко регулировать. В последние годы накоплен значительный материал по синтезу, изучению фотохимических свойств и биологическому применению новых реагентов, содержащих фотореакционноспособные группы, а также по установлению строения продуктов фотомодификации НК этими реагентами.

Актуальной задачей является разработка реагентов, расщепляющих ДНК, химически стабильных и активируемых светом. Они полезны для изучения структуры ДНК как фотонуклеазы, как реагенты для фотофутпринтинга и потенциальные фотореагенты для фототерапии рака и вирусных инфекций.<sup>11–13</sup>

Фотосенсиблизированными реакциями модификации НК принято считать реакции, которые индуцируются светом с длинами волн больше, чем собственное поглощение НК.<sup>14</sup> Они включают в себя три основных типа:<sup>15,16</sup> фотоокисление радикальными частицами и с помощью фотоиндуцированного переноса электрона (фотодинамический эффект I типа), фотоокисление синглетным кислородом (фотодинамический эффект II типа) и реакции свободнорадикального и электрофильного присоединения, не требующие участия кислорода (фотодинамический эффект III типа).

Классифицировать фотосенсиблизированные реакции НК достаточно сложно и любое их описание неоднозначно, поскольку известно много фотохимических реакций, часто они протекают параллельно и обладают невысокими квантовыми выходами. Изучение фотореакций осложняется тем,

---

М.И.Добриков. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИБХ СО РАН. Телефон: (383) 233–3762, e-mail: Dobmi@niboch.nsc.ru  
Область научных интересов: фотохимия, органический синтез, конструирование ген-направленных биологически активных веществ.

Дата поступления 13 апреля 1999 г.

---

что одни и те же конечные продукты фотомодификации могут образовываться по разным механизмам.<sup>7</sup>

В данном обзоре проанализированы важнейшие фотосенсибилизированные реакции свободнорадикального и электрофильного присоединения, не требующие участия кислорода. Одно-<sup>17,18</sup> и двухквантовые<sup>19,20</sup> фотохимические реакции немодифицированных НК, индуцированные дальним УФ-светом (190–300 нм), фотоокисление ДНК синглетным кислородом,<sup>3,7,21</sup> радикальными частицами<sup>22–24</sup> и окисление за счет фотоинициированного переноса электрона<sup>11,25,26</sup> изучены достаточно подробно и в данном обзоре рассматриваться не будут.

## II. Фотореакции свободнорадикального циклоприсоединения и электрофильного присоединения нуклеиновых кислот

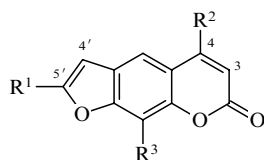
Известно несколько видов фотосенсибилизированных реакций химической модификации НК, не требующих участия кислорода,<sup>14,16</sup> в том числе реакции свободнорадикального фотоциклоприсоединения по двойным связям оснований,<sup>27–45</sup> фотоиндуцированного алкилирования,<sup>46–58</sup> арилирования,<sup>59–63</sup> ацилирования,<sup>27,64</sup> и другие реакции электрофильного присоединения. Модификация НК высокоэлектрофильными частицами, образующимися в ходе фотохимических реакций, особенно привлекательна, поскольку электрофильные частицы проявляют ярко выраженную селективность по отношению к нуклеофильным основаниям, таким как гуанин и аденин. Реакции фотоциклоприсоединения, в свою очередь, высокоселективно протекают по двойным связям пиримидиновых оснований.<sup>27</sup>

### 1. Свободнорадикальное фотоциклоприсоединение

При возбуждении большинства кетонов и тиокетонов образуются бирадикальные частицы, способные инициировать реакции радикального циклоприсоединения по двойным связям гетероциклических оснований НК. Наиболее известными и эффективными фотореагентами этого типа являются производные псоралена и тиопиримидинов.

#### а. Фотомодификация нуклеиновых кислот производными псоралена

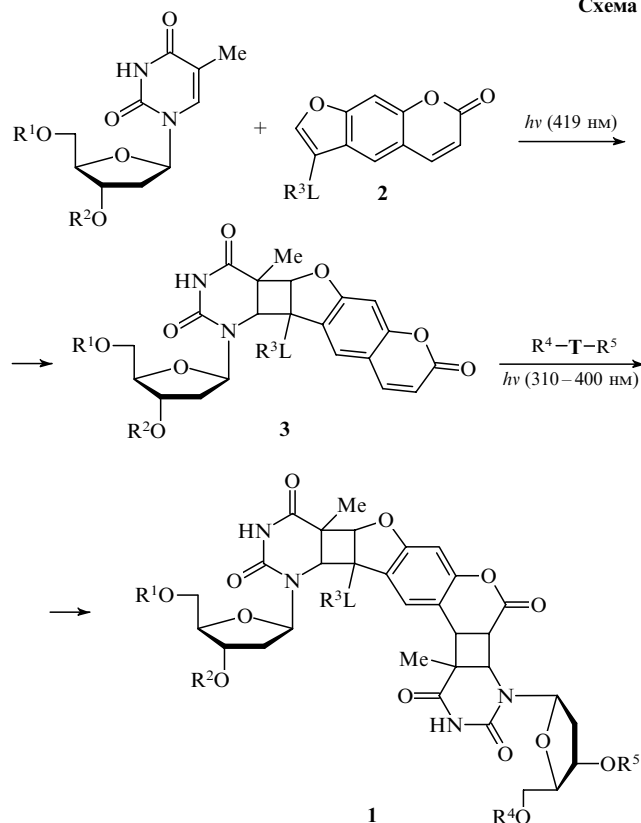
Псоралены (7*H*-фуро[3,2-*g*][1]бензопиран-7-оны) — трициклические ароматические соединения — имеют плоскую структуру и способны интеркалировать между парами оснований двухцепочечной ДНК (дц-ДНК). Они содержат две фотореакционноспособные двойные связи: C(3)=C(4) в пироновом кольце и C(4')=C(5') в фурановом.



R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = H, Alk.

Псоралены при совместном облучении с ДНК-дуплексами светом в диапазоне 310–420 нм ковалентно связываются с пиримидиновыми основаниями ДНК, предпочтительно с тиминам, по связи C(5)=C(6) с образованием циклобутановых аддуктов (см., например, схему 1). Они также способны вступать в реакции фотоприсоединения с цитидином, однако реакция идет в 15 раз медленнее, чем с тимидином.<sup>1</sup> Псоралены являются бифункциональными фотореагентами, они способны сшивать обе цепи ДНК, особенно когда интеркалируют в последовательности 5'-ТрА-3'.<sup>1,28–38</sup> Фрагменты 5'-ТрА/3'-АрТ содержатся в сигнальных последовательностях многих генов и являются

Схема 1



L = CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-p, R<sup>1</sup>–R<sup>5</sup> — фрагменты олигонуклеотидных цепей.

потенциальными мишенями для олигонуклеотидов, содержащих остатки псораленов.

Методом молекулярного моделирования показано,<sup>1</sup> что псорален может встраиваться между нуклеотидами мишени двумя путями: либо между нуклеотидами N<sub>n</sub> и N<sub>n+1</sub> и N<sub>n</sub>, либо между нуклеотидами N<sub>n</sub> и N<sub>n-1</sub>, где N<sub>n</sub> — нуклеозид, комплементарный 5'-концевому нуклеозиду псораленового конъюгата. В первом случае реализуется наиболее выгодная для фотоприсоединения пространственная структура реакционного центра. Встраивание псоралена протекает наиболее эффективно, если в позициях мишени n+1 и n-1 находятся остатки тимидина, а в позиции n — аденозин. В этом случае реакция идет сразу по обоим возможным направлениям. При этом выход комплекса с ковалентно связанными цепями типа 1 достигает 95%.

В последние годы псораленовые производные олигонуклеотидов используют прежде всего для фотомодификации дц-ДНК.

В работе<sup>29</sup> показано, что 16-членный конъюгат Pso-CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-p-5'-TTTTCTTTTCCCCCCT 2 образует триплекс с участками ДНК HIV-1, содержащими гомопурин-гомопиримидиновые последовательности. Псорален интеркалирует в дц-ДНК, увеличивая температуру плавления триплекса с 20 до 29°C. При облучении УФ-светом с длиной волны > 310 нм образуются моно- и бисаддукты 3 и 1, что подтверждено данными измерений электрофоретической подвижности в геле. Вначале происходит присоединение фуранового кольца псоралена к C(5)=C(6)-связи тимина, находящегося после 5'-конца гомопуриновой последовательности ДНК-мишени, которое приводит к циклобутановому аддукту 3. Затем протекает фотохимическое циклоприсоединение пиронового кольца аддукта 3 к C(5)=C(6)-связи 3'-концевого тимина гомопиримидиновой цепи с образованием бисаддукта 1.

Участок ДНК HIV-1 содержит две последовательности — мишени для конъюгата **2**. Высокоэффективные сшивки проходят по обеим. Помимо этого, при более высоких экспозициях и концентрациях олигонуклеотидного реагента **2** сшивки образуются в местах, где 5'-концевой 8-членный фрагмент (T<sub>4</sub>CT<sub>3</sub>) конъюгата **2** способен связываться с дц-ДНК. Причиной такой модификации является то, что последовательность (pC)<sub>6</sub> конъюгата **2** не может быть протонирована целиком в физиологических условиях и вся специфичность 16-членного конъюгата **2** определяется (T<sub>4</sub>CT<sub>4</sub>)-фрагментом. Замена участка (pC)<sub>6</sub> на (pG)<sub>6</sub> приводит к фотомодификации только по двум специфическим последовательностям.<sup>29</sup>

В работе<sup>29</sup> изучено влияние длины олигонуклеотидного адреса на степень модификации дц-ДНК мишени *in vitro*. Олигонуклеотидные 10- и 16-членные конъюгаты псоралена оказались эффективными для сиквенс-специфической фотосшивки дц-ДНК мышей, а 8-членный олигонуклеотидный реагент оказался неэффективным. Показано, что 10-членный конъюгат быстро, менее чем за 10 мин, связывался с дц-ДНК.

Конъюгат 5-алкокипсоралена и 5'-pTTTTC\*С\*ТС\*ТС\*С\*С\*ТС\*Т, где С\* — остатки 5-метилцитозина, введенные для увеличения стабильности триплекса, был использован для ингибирования экспрессии гена  $\alpha$ -цепи рецептора интерлейкина 2.<sup>30</sup> Конъюгат связывался с гомопурин-гомопиримидиновой последовательностью промотора, образуя триплекс. В качестве контроля была использована мутантная форма промотора, содержащая трансверсию трех нуклеотидов в центре гомопурин-гомопиримидиновой последовательности. С мутантным промотором конъюгат не связывался.

При облучении УФ-светом (365 нм) протекает фотоциклоприсоединение псоралена с участием 3,4- и 4',5'-двойных связей к C(5)=C(6)-связям последовательности 5'-ТрА-3', расположенной на стыке дуплекс–триплекс. Реакция приводит к бисаддукту **1**. Образование ковалентно связанного триплекса вызывало ингибирование транскрипции *in vitro*. Транскрипция мутантной формы промотора не ингибировалась. После проведения фотомодификации ДНК *in vitro* фотосшитый триплекс был трансфицирован в клетки человека HeLa. Облученный мутантный промотор транскрибировался так же эффективно, как и необлученный промотор; активность облученного промотора падала на 80% (в соответствии с выходом фотосшивки).

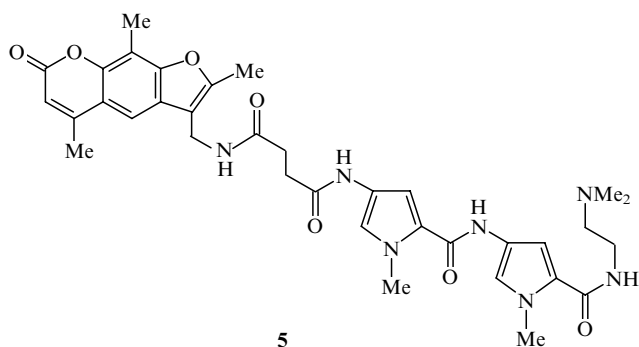
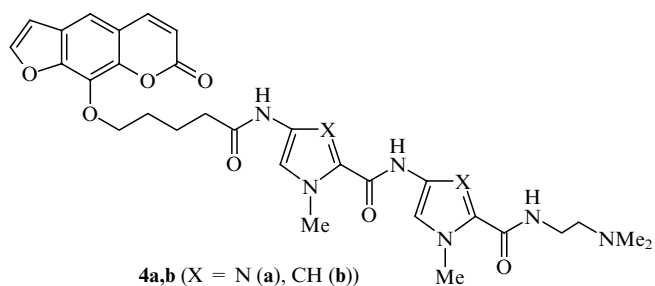
Наиболее полно образование фотоаддуктов в триплексе дц-ДНК бактериофага  $\lambda$  с конъюгатом 4,5',8-триметил-4'-гидроксиметил-Р<sub>so</sub>-pAGGAAGGGGG было изучено в работе<sup>31</sup>. Показано, что квантовый выход ( $\phi$ ) моноаддукта **3** составлял 0.0065, а  $\phi$  бисаддукта **1** был в 5 раз больше. Для получения бисаддукта **1** необходимо, чтобы вначале в реакцию вступала C(4')=C(5')-связь фуранового кольца псоралена, а затем C(3)=C(4)-связь пиринового кольца. В противном случае образования бисаддукта не происходит. Поэтому было предложено проводить облучение ступенчато: сначала видимым светом (419–447 нм), а затем УФ-светом (> 310 нм). Эффективность фотомодификации при облучении видимым светом в 400 раз ниже, чем УФ-светом, но при этом избирательно образуется моноаддукт **3** по остатку T166 (выход 40%). Последующее УФ-облучение приводит к бисаддукту **1** (выход 62%) и моноаддуктам (выходы 9% по пиримидиновому и 22% по пуриновому участкам цепи). При таком двухстадийном облучении суммарная степень фотомодификации дц-ДНК достигала 95%.

При облучении видимым светом (419 нм) в течение 30 мин дц-ДНК в комплексе с триплекс-образующим псораленовым конъюгатом **2** получен моноаддукт **3** с выходом 87%. Дальнейшее облучение УФ-светом в течение 5 мин приводит к бисаддукту **1** (выход достигал 92%).<sup>31</sup> 4,5',8-Триметил-4'-гидроксиметилпсораленовое производное олигонуклеотида pAGGAAGGGGG было использовано для

сайт-специфического повреждения supF-гена, включенного в вектор  $\lambda$  фага *E. coli*<sup>32</sup> и в вектор вируса SV40.<sup>33</sup> Показано, что образование и фотосшивка триплекса могут происходить *in vivo*.<sup>34</sup>

Описано ингибирование экспрессии гена 5-гидроксипсораленовыми конъюгатами (Pso-pTC\*TTC\*TTC\*С\*ТС\*Т-С\*ТТ, где С\* — 5-метилцитозин) в трансфицированных клетках HeLa.<sup>38</sup> После УФ-облучения (> 310 нм) *in vitro* триплекса амплификация одного из фрагментов ДНК ингибировалась на 95%. Плазмиду pCH110 фотомодифицировали и вводили в клетки HeLa. Активность гена встроенной в нее  $\beta$ -галактозидазы была 5% через 5 ч после трансфекции.

Для увеличения проникновения производных псоралена через гидрофобные клеточные мембраны и повышения устойчивости к нуклеазному гидролизу было предложено присоединять псорален к дистамицин-подобным производным имидазола **4a** и пиррола **4b**, **5**.<sup>35–37</sup>



Имидазольные аналоги дистамицина **4a** способны доставлять псорален к GC-богатым, а пиррольные аналоги **4b**, **5** — к AT-богатым участкам ДНК. Имидазольный аналог **4a** в 10 раз эффективнее фотомодифицирует ДНК, чем исходный псорален. Эффективность фотомодификации дц-ДНК пиррольным аналогом **4b** в 1000 раз больше, чем псораленом, и в 100 раз больше, чем имидазольным аналогом.<sup>1</sup>

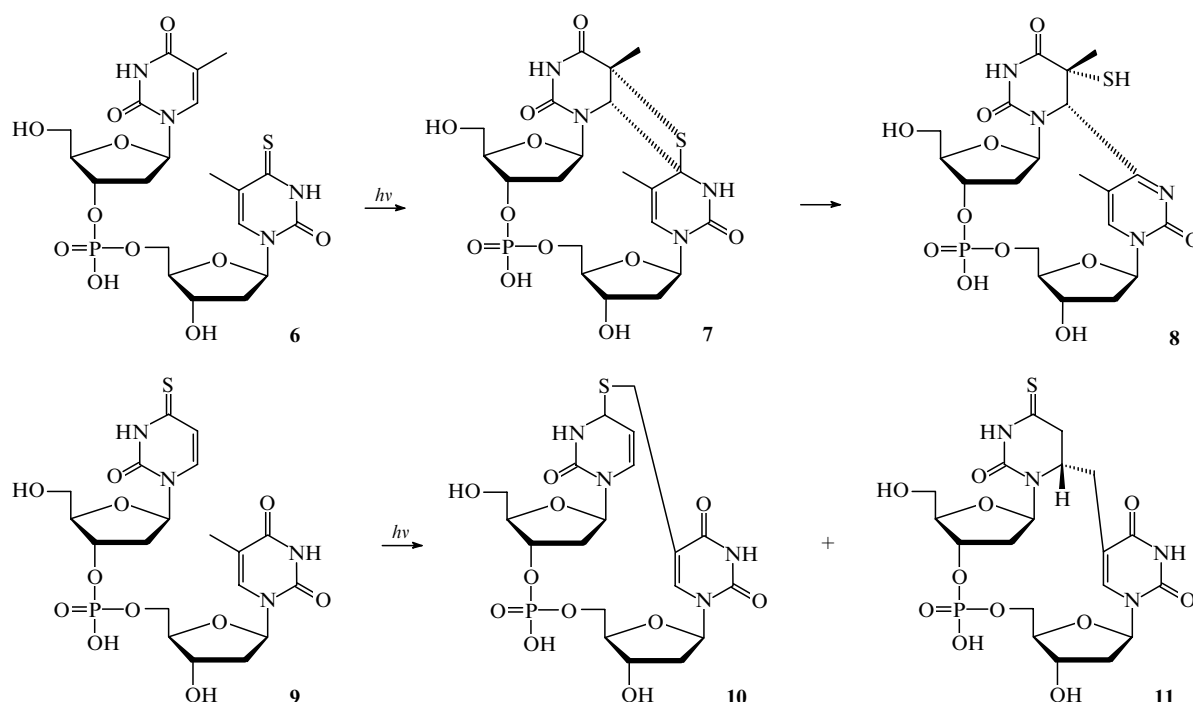
Представленные данные показывают, что псораленовые конъюгаты перспективны для фотомодификации НК *in vivo*. Высокая фототоксичность псораленов при модификации дц-ДНК определяется образованием бисаддуктов **1**.

## 6. Фотомодификация нуклеиновых кислот производными 4-тиопиримидина

Наряду с псораленами в качестве фотореагентов, инициирующих реакции сводобнорадикального циклоприсоединения, используют тиопиримидиновые нуклеотиды — 4-тиоурин (s<sup>4</sup>U) и 4-тиотимидин (s<sup>4</sup>T). Наличие атома серы вместо атома кислорода в положении 4 приводит к смещению спектра поглощения в длинноволновую область ( $\lambda$  = 330 нм) и появлению новых фотохимических свойств.<sup>39,40</sup>

Облучение тиопиримидинов УФ-светом (330 нм) приводит к заселению S<sub>2</sub>-возбужденного состояния, которое быстро (за 5 пс) и с высоким квантовым выходом ( $\phi$  = 0.9) претерпевает конверсию в T<sub>1</sub>-состояние. При фотолизе d(s<sup>4</sup>U) в воде в присутствии кислорода образуется dU.<sup>40</sup>

Схема 2



Тиопиримидиновые нуклеотиды способны образовывать ковалентные аддукты со всеми природными нуклеиновыми основаниями, но квантовый выход фотореакции с пиримидиновыми основаниями выше, чем с пуриновыми. Облучение динуклеотида d-Trp(s<sup>4</sup>U) (**6**) приводит с квантовым выходом 0.02 к двум стабильным продуктам **7** и **8** (схема 2). Считается, что первоначально происходит [2+2]-циклоприсоединение тиопиримидина с участием возбужденной связи C=S к C(5)=C(6)-связи пиримидина с образованием аддукта **7**, затем вторичные химические реакции приводят к продукту **8**.<sup>40</sup>

При облучении динуклеотида d-(s<sup>4</sup>U)pT (**9**) выделены аддукты **10** и **11** (схема 2). Вероятнее всего, они образуются

за счет отрыва атома H от метильной группы тимина фото-возбужденным тиоуридином с последующей рекомбинацией радикальных частиц.<sup>40</sup>

Существенным преимуществом тиопиримидинов как фотореагентов является то, что ван-дер-ваальсов радиус атома серы всего на 0.45 Å больше, чем радиус атома кислорода. Это практически не влияет на структуру олиго- и полинуклеотидов, в состав которых введены остатки тиопиримидинов.<sup>39</sup> Наиболее полно фотохимические свойства тиопиримидинов были использованы для изучения третичной структуры и механизма действия рибозимов (рис. 1).<sup>39–45</sup> Остатки тиоуридина вводили в РНК-субстрат в положения X. После облучения комплекса рибозима с РНК наблюдалось образование ковалентных сшивок (указаны на рис. 1 стрелками). Показано (данные фотоаффинной модификации), что в растворе в комплексе рибозима с РНК возможно образование нескольких альтернативных конформаций на разных стадиях каталитического цикла гидролиза РНК-субстрата.<sup>40–42</sup>

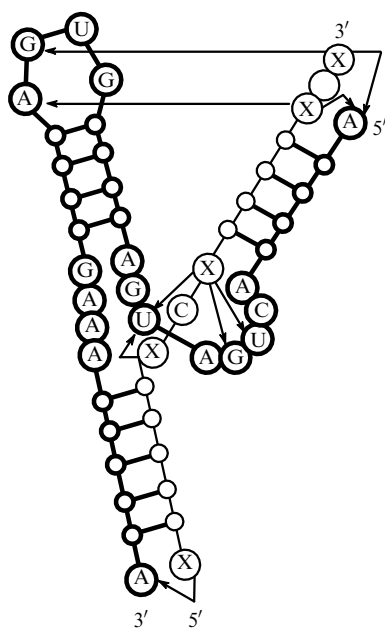


Рис. 1. Структура комплекса рибозима (выделен жирным) с фрагментом РНК.

## 2. Фотоиндуцированное алкилирование ДНК

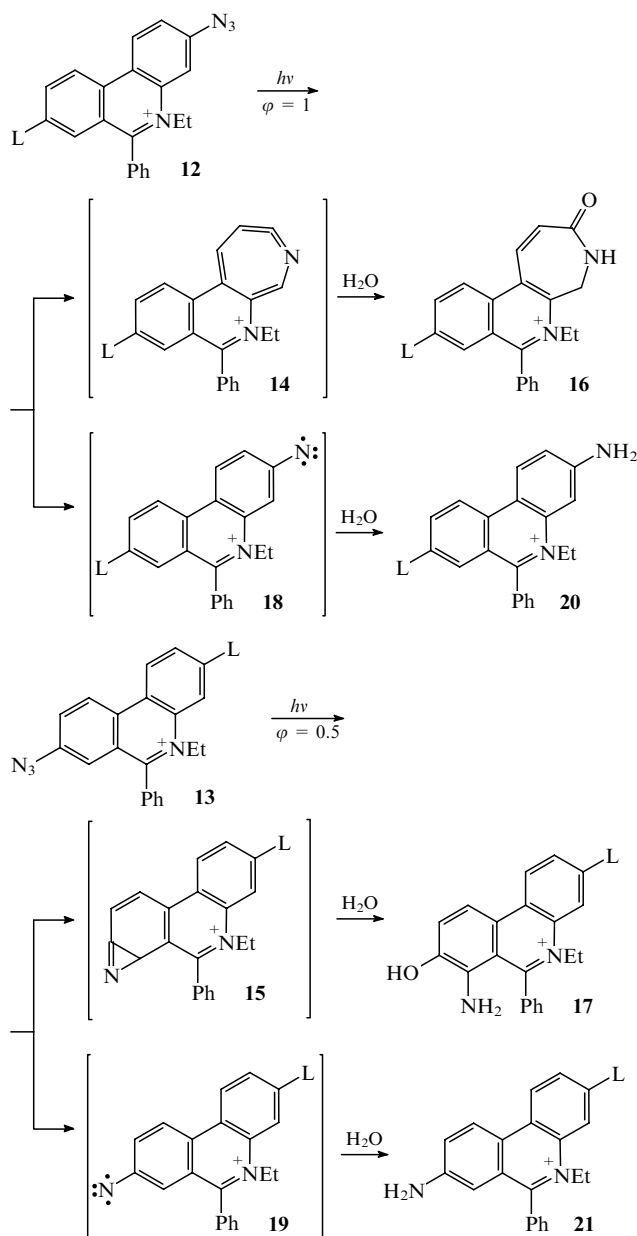
Описаны многочисленные фотохимические методы генерации электрофильных частиц, алкилирующих ДНК.<sup>27, 46–58</sup> Они включают образование азациклогептатетраена через промежуточный синглетный нитрен фоторазложением ароматических азидов,<sup>46–52</sup> генерацию хинолилметилкарбокатиона гетеролитическим фоторазложением хинолилметилизотиоурониевых солей,<sup>53</sup> получение хинонметид фотокислотами производных 5- и 2-метилнафтохинона<sup>54–57</sup> и генерацию оксониевых катионов из монотиоацеталей за счет фотоиндуцированного переноса электрона.<sup>58</sup>

### а. Фотомодификация нуклеиновых кислот ароматическими азидами

Олигонуклеотидные производные ароматических азидов широко применяют для фотомодификации ДНК<sup>46, 47, 50–52</sup> и РНК,<sup>48, 49</sup> что обусловлено их высокой фотоактивностью и легкостью синтеза.

Изучены конформационные изменения *n*-азидофенацил-5'-тиофосфатного производного рибозима L-21 Sca I на различных стадиях связывания и каталитического расщепления РНК-субстрата.<sup>48,49</sup> При облучении УФ-светом (312 нм) фотоактивного производного рибозима в отсутствие РНК-субстрата с выходом 12% образуются ковалентные аддукты по остаткам A88\A89\A90. В комплексе с фрагментом GGCCCUCUAAAAA, в котором рибозим гидролизует фосфодиэфирную связь между остатками уридина и аденина, фотомодифицировались остатки A114\A115 рибозима (выход 34%), а в отсутствие катионов  $Mg^{2+}$  — остатки C102\A103\A104 (выход 38%).<sup>48</sup> Полученные данные позволили установить расположение внутренней направляющей последовательности (IGS) рибозима, содержащей *n*-азидофенацильный остаток, на различных стадиях каталитического цикла расщепления РНК-субстрата.<sup>48,49</sup>

Наиболее эффективными фотореагентами для модификации ДНК оказались производные этидия **12** и **13**.<sup>50,51</sup> Вероятнее всего, это обусловлено способностью этидиевых остатков интеркалировать в ДНК и особенностями фотохимии полиароматических азидов. Изучены продукты фотолиза азидов **12** и **13** в воде.<sup>51</sup>



L = NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

При этом образуются промежуточные электрофильные частицы — азациклогептатетраен **14** и азиридин **15**, — которые способны присоединять воду, давая аддукты **16** и **17**. В обоих случаях наблюдалось образование триплетных нитренов **18** и **19**, которые с точки зрения фотомодификации НК расходовались непродуктивно, восстанавливаясь в амины **20** и **21** соответственно.

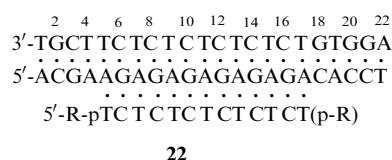
Формально, азид **13** при фотолизе в присутствии нуклеофилов должен давать продукты их арилирования типа **17**, но поскольку такие продукты не описаны, он рассмотрен здесь для удобства сравнения фотореагентов.

Конъюгаты гептануклеотида pCCAAACA с остатками азидов **12** и **13** на 5'-фосфате были использованы для сайт-специфической фотомодификации меченного изотопом <sup>32</sup>P комплементарного октануклеотида 5'-\*pTGT TTTGGC.<sup>51</sup> Введение азидоэтидиевых остатков значительно стабилизирует комплементарные комплексы, увеличивая их температуру плавления на 20–30°C.



При облучении этих дуплексов УФ-светом (320 нм) образуются ковалентные аддукты с выходом 40 и 60% соответственно. После обработки пиперидином, вызывающей расщепление цепи ДНК по модифицированному основанию, суммарная степень фотомодификации октануклеотида увеличивалась до 70 и 80% соответственно. Результаты проведения пиперидин-зависимого расщепления позволили сделать вывод, что модификации преимущественно подвергался остаток C8 и, в меньшей степени, G7 (показаны стрелками). С помощью ВЭЖХ обнаружено образование до 10 разных аддуктов (многие из них нестабильны), выделить и установить строение которых авторам не удалось.

Олигонуклеотиды p(TC)<sub>6</sub>Tr с остатками азидов **12** и **13** на концевых фосфатах использованы для фотомодификации дц-ДНК в триплексе **22**.<sup>50</sup>



Облучение триплекса **22** (320–420 нм) с конъюгатом 5'-(**12**)p(TC)<sub>6</sub>T в качестве фотореагента приводило к спонтанному расщеплению пурин-богатой цепи по остатку G3 (степень фотомодификации 15%) и к образованию с выходом 30% ковалентных аддуктов по этому же остатку. Пиримидин-богатая цепь фотомодифицировалась в значительно меньшей степени, при этом наблюдалось только образование ковалентных аддуктов по остатку T4 (выход 10%).

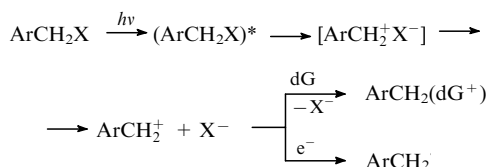
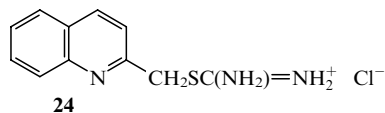
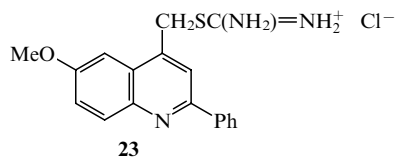
При использовании производного 3'-(**12**)p(TC)<sub>6</sub>T в качестве фотореагента суммарная степень фотомодификации по обеим цепям не превышала 10%.

Облучение триплекса **22** с реагентом 5'-(**13**)p(TC)<sub>6</sub>T вызывало высокоселективную фотомодификацию пиримидин-богатой цепи. Прямого расщепления не наблюдалось; получены ковалентные аддукты (выход 35%) и продукты модификации остатка T4, выявленные с помощью пиперидинового расщепления.<sup>50</sup>

## 6. Фотомодификация ДНК бензилотиоурониевыми солями

Изучение фотолиза ряда бензильных соединений типа ArCH<sub>2</sub>X, способных генерировать карбокатионы, показало, что наиболее фотоактивны хинолил-2(4)-метилиотиоурониевые соли **23** и **24**. При их облучении в воде УФ-светом

(350 нм) получены карбокатионы  $\text{ArCH}_2^+$  с выходом 90% и квантовым выходом 0.09.<sup>53</sup>



dG — дезоксигуанозин.

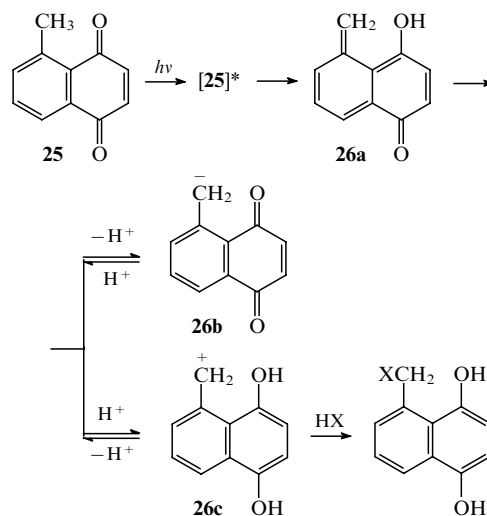
Фотомодификация дц-ДНК солями **23** и **24** приводила к незначительному ее расщеплению, независимо от последовательности. Вероятнее всего, реакция протекает за счет отрыва атома водорода от дезоксирибозы параллельно образующимся бензильным радикалом ( $\text{ArCH}_2^\bullet$ ) с последующим кислород-зависимым расщеплением ДНК-мишени. После обработки пиперидином наблюдалось 10-кратное увеличение степени модификации за счет G-специфического расщепления. Считается, что остатки хинолина интеркалируют в ДНК таким образом, что положительно заряженные изотиоурониевые остатки реагентов **23** и **24** располагаются на поверхности дуплекса. Наиболее вероятным механизмом G-специфической модификации считается алкилирование остатков гуанина по положению N(7) фотоиндуцированным хинолилметилкарбокатионом. Квантовый выход продуктов фотоалкилирования невелик ( $\varphi = (5-6) \cdot 10^{-6}$ ), выход аддуктов в расчете на фотореагент не превышает 1%.<sup>53</sup> Вследствие невысокой эффективности фотоалкилирования подобные фотореагенты не нашли широкого распространения.

#### в. Фотоалкилирование нуклеиновых кислот метилнафтохинонами

Модификация одноцепочечной ДНК (оц-ДНК) олигонуклеотидным производным 5-метил-1,4-нафтохинона при облучении УФ-светом ( $> 345$  нм) является наиболее изученным примером фотоиндуцированного алкилирования НК.<sup>54-56</sup> В отличие от фотомодификации изотиоурониевыми солями **23** и **24**, в этом случае не было обнаружено продуктов окислительного расщепления ДНК-мишени, а наблюдалось образование только продукта алкилирования с выходом  $\sim 20\%$ . Ни обработка пиперидином (расщепление ДНК при наличии алкилированных по гетероциклическим атомам азота оснований), ни обработка боргидридом натрия (расщепление по пиримидиновым основаниям с насыщенной связью C(5)—C(6)) не вызывает расщепления мишени. Предоблучение фотореагента полностью инактивирует его за счет фоторазложения замещенного нафтохинона.<sup>54</sup> Показано, что фотогенерируемые хинонметиды алкилируют остатки G и C по экзоциклическим аминогруппам. Такие аддукты стабильнее при щелочном расщеплении ДНК по сравнению с продуктами обычного алкилирования.<sup>56</sup>

Изучена эффективность фотоалкилирования ДНК олигонуклеотидными производными 1,4-нафтохинон-3-тиопропионовой кислоты, содержащими заместители в положениях 2, 5 и 6.<sup>55</sup> Наиболее активными оказались 5-метилзамещенные нафтохиноны, степень алкилирования которыми одноцепочечных участков ДНК достигала 27%. Выход продуктов

алкилирования ДНК 2- и 6-метилнафтохинонами не превышал 6–8%.

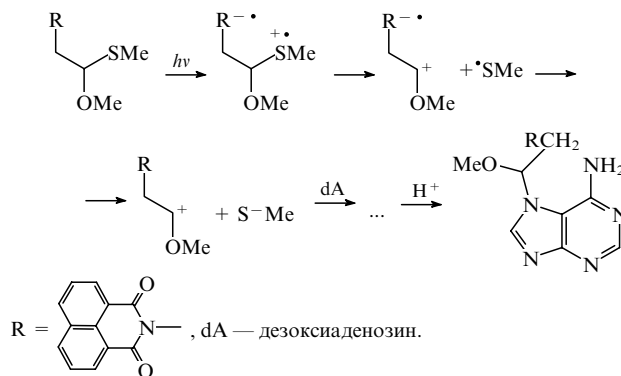


Механизм фотоалкилирования ДНК 5-метилнафтохиноном (**25**) в водных растворах был изучен совсем недавно.<sup>57</sup> При фотовозбуждении нафтохинона **25** быстро и с высоким квантовым выходом переходит в 4-гидрокси-5-метилен-нафталин-1(5H)-он (**26a**), который способен депротонироваться, давая нафтохинон-5-карбанион (**26b**), либо протонироваться с образованием соответствующего карбокатиона **26c**. Лимитирующей стадией фотоиндуцированного алкилирования является реакция карбокатиона **26c** с нуклеофилами (HX).

При фотоллизе в физиологических условиях в основном образуется карбанион **26b**, поскольку значение его  $pK_a$  равно 6.5, а значение  $pK_a$  карбокатиона **26c** — 1.1. Это является главной причиной невысокой эффективности фотоалкилирования ДНК метилнафтохинонами.

#### г. Фотомодификация нуклеиновых кислот арилмоноацетальдами

При облучении моноацеталей, производных 1,8-нафталимидов, УФ-светом ( $> 330$  нм) генерируются S-центрированные катион-радикалы за счет внутримолекулярного переноса электрона на фотовозбужденный нафталимид. Катион-радикал расщепляется, давая карбокатион и алкилтио-радикал, который быстро восстанавливается анион-радикалом нафталимидов.<sup>58</sup>



Карбокатион способен реагировать с нуклеофилами (например, реакция с MeOH в отсутствие кислорода идет с выходом 98% и квантовым выходом 0.038), давая продукты алкилирования.

Моноацеталь 1,8-нафталимидоацетальдегида облучали в присутствии триплетного сенсibilизатора (ацетофенона) УФ-светом с длиной волны 366 нм; при этом 99% света

поглощается ацетофеноном. Таким образом, доказано, что перенос электрона идет через триплетное состояние нафталимида.

Суперскрученная ДНК pBR322 при облучении УФ-светом (365 нм) в присутствии указанного моноитоацетата после нагревания превращалась в кольцевую. Основным продуктом фотомодификации ДНК оказался алкилированный по положению N(7) аденин.<sup>58</sup>

Таким образом, в настоящее время известно несколько типов электрофильных фотореагентов, пригодных для фотоалкилирования НК при облучении ближним УФ-светом (320–400 нм). Однако невысокая эффективность этих реагентов и отсутствие фотоактивности в видимой области спектра ограничивает их использование для фотомодификации НК *in vivo*.

### 3. Фотоариллирование ДНК

Полипиридинные комплексы рутения(II) способны фотосенсибилизировать образование одноцепочечных разрывов в дц-ДНК с низким квантовым выходом ( $\phi = (1-7) \cdot 10^{-6}$ ).<sup>59,60</sup> Для изучения механизма расщепления короткие 5'-меченные олигонуклеотиды облучали видимым светом (436 нм) вместе с комплексом Ru(TAP)<sub>3</sub>, где TAP — 1,4,5,8-тетраазафенантрен. Обнаружено, что основной фотосенсибилизированной реакцией является не расщепление олигонуклеотидных цепей, а образование ковалентных аддуктов комплекса Ru(II) с олигонуклеотидом.<sup>59,61</sup> Выход аддуктов в ряду Ru(bipy)<sub>n</sub>L<sub>3-n</sub> (L = TAP или НАТ, bipy — 2,2'-бипиридил, НАТ — 1,4,5,8,9,12-гексаазатрифенилен) при  $n = 0, 1$  был довольно высокий, а при  $n = 2, 3$  образования ковалентных аддуктов не наблюдалось.

При увеличении  $n$  происходит изменение фотохимических свойств комплексов Ru(II) и Os(II), а именно батохромный сдвиг максимумов поглощения и флюоресценции и снижение потенциала восстановления ( $E_{\text{red}}^*$ ) возбужденного состояния (табл. 1). Ковалентные аддукты с ДНК-мишенью образуются только для тех комплексов Ru(II) и Os(II), значение  $E_{\text{red}}^*$  которых больше, чем окислительный потенциал гуанозинмонофосфата ( $E_{\text{ox}} = 0.92$  В).

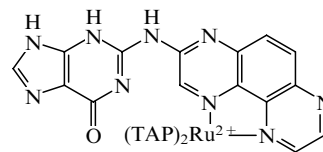
Как электрофильные фотореагенты биметаллические комплексы [Ru(bipy)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>НАТ и [Ru(phen)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>НАТ (phen — *o*-фенантролин) представляют значительный интерес, поскольку они также дают ковалентные аддукты с ДНК, а максимумы их поглощения смещены батохромно примерно на 100 нм относительно монометаллических комплексов.

При фотомодификации дц-ДНК комплексом Ru(TAP)<sub>3</sub> выделен и охарактеризован ковалентный аддукт. В нем экзоциклическая 2-аминогруппа гуанина ковалентно связана с положением C(2) остатка TAP. При фотомодификации ДНК комплексами Ru(bpz)<sub>3</sub> (bpz — 2,2'-бипиридазинил),

**Таблица 1.** Фотохимические свойства комплексов Ru(II) и Os(II): максимумы поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$ ) и флюоресценции ( $\lambda_{\text{fl}}$ ), значения потенциала восстановления ( $E_{\text{red}}^*$ ) фотовозбужденных триплетных состояний и возможность образования ковалентных аддуктов с ДНК.<sup>61</sup>

| Комплексы                                 | $\lambda_{\text{max}}$ , нм | $\lambda_{\text{fl}}$ , нм | $E_{\text{red}}^*$ , В | Аддукты |
|-------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------|---------|
| Ru(НАТ) <sub>3</sub>                      | 440                         | 596                        | 1.46                   | +       |
| Ru(bipy)(НАТ) <sub>2</sub>                | 472                         | 661                        | 1.12                   | +       |
| Ru(bipy) <sub>2</sub> (НАТ)               | 484                         | 742                        | 0.83                   | —       |
| Ru(TAP) <sub>3</sub>                      | 437                         | 608                        | 1.32                   | +       |
| Ru(bipy)(TAP) <sub>2</sub>                | 465                         | 649                        | 1.06                   | +       |
| Ru(bipy) <sub>2</sub> (TAP)               | 484                         | 714                        | 0.86                   | —       |
| [Ru(bipy) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> НАТ | 572                         | 800                        | 1.03                   | +       |
| [Ru(phen) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> НАТ | 564                         | 820                        | 1.02                   | +       |
| Os(TAP) <sub>3</sub>                      | —                           | —                          | 1.11                   | +       |

Ru(TAP)<sub>2</sub>bipy,<sup>61</sup> [Ru(phen)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>НАТ<sup>60</sup> и Os(TAP)<sub>3</sub><sup>59</sup> были выделены такие же фотоаддукты.



Хотя полипиридинные комплексы Ru(II) интеркалируют в дц-ДНК через большую бороздку, образование ковалентных аддуктов протекает в малой бороздке.

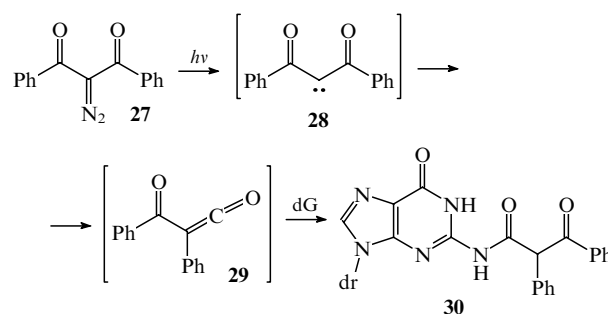
Механизм фотосенсибилизированного арилирования ДНК комплексами Ru(II) до конца не выяснен, хотя предполагается, что первоначально происходит фотоиндуцированный перенос электрона с остатка гуанина на возбужденный лиганд TAP\*, затем — перенос протона с катион-радикала G<sup>++</sup> на анион-радикал TAP<sup>—•</sup>, рекомбинация радикалов и окислительная реароматизация остатка TAPNH<sub>2</sub>.<sup>59,61</sup>

Олигонуклеотидные конъюгаты полипиридинных комплексов Ru(II) были использованы для изучения фотоиндуцированного переноса электрона,<sup>62,63</sup> но данные о комплементарно-адресованной фотомодификации ДНК этими производными отсутствуют.

Следует отметить, что полипиридинные комплексы металлов открывают широкие возможности для конструирования фотореагентов, пригодных для модификации НК *in vivo*. Это обусловлено тем, что свойства таких комплексов можно регулировать в широких пределах, меняя центральный атом металла и лиганды.

### 4. Фотоацилирование ДНК

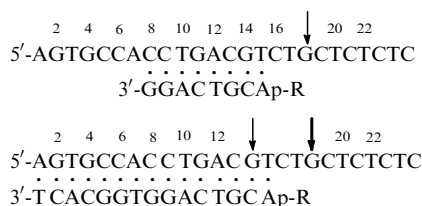
Известно, что фотоиндуцированная диссоциация дибензоил-диазометана (**27**) приводит к дибензоилкарбену (**28**), который после перегруппировки Вольфа превращается в электрофильный кетен **29**, способный вступать в реакции с нуклеофилами.<sup>27,64</sup> Так, при фотолизе (366 нм) в присутствии 3,5-ди-*O*-(*трет*-бутилдифенилсилил)-2'-дезоксигуанозина образуется ацилированный по экзоциклической аминогруппе гуанозин **30**.<sup>27</sup>



dr — дезоксирибоза.

При совместном облучении дибензоилдиазометана (**27**) с оц-ДНК в присутствии NaN<sub>3</sub> — ловушки синглетного кислорода — получены ковалентные аддукты, которые обрабатывали пиперидином. При этом происходит G-специфическое расщепление, обусловленное реакцией с кетеном **29**, и незначительное неспецифическое расщепление за счет отрыва атома водорода от дезоксирибозы карбеном **28**.<sup>27</sup>

Сайт-специфическая фотомодификация 25-членного фрагмента оц-ДНК 8- и 15-членными комплементарными олигонуклеотидными конъюгатами с заместителем R на 5'-концевом фосфате в присутствии NaN<sub>3</sub> приводит только к ковалентным аддуктам с выходами 32 и 47% соответственно.



Обработка продуктов фотомодификации пиперидином вызывала в обоих случаях расщепление мишени по остатку G18, находящемуся в одноцепочечном фрагменте дуплексов, в случае 15-звенного реагента наблюдалось дополнительное расщепление по остатку G14 (показано стрелками). Большая часть аддуктов пиперидином не расщепляется. Суммарная степень модификации после обработки пиперидином увеличивалась до 33 и 56% соответственно. Образование пиперидин-лабильных аддуктов обусловлено ацилированием по положению N(7) гуанина, а пиперидин-стабильных аддуктов — ацилированием по экзоциклической аминогруппе.<sup>27</sup>

Таким образом, замещенные диазодикетоны могут быть весьма перспективными реагентами для G-специфического фотоацилирования НК.

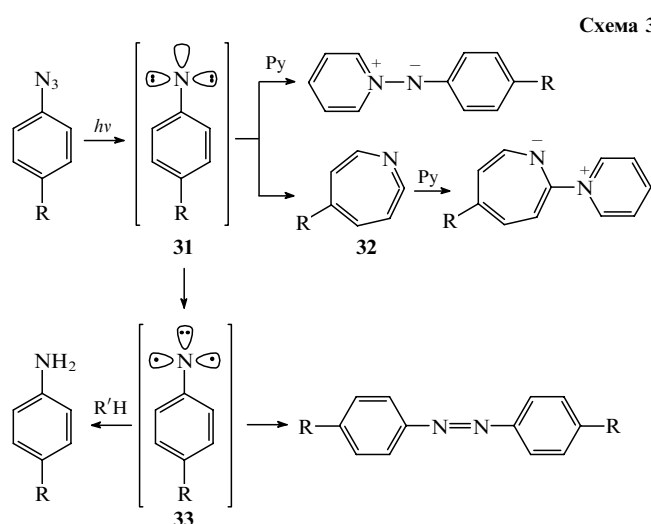
### 5. Другие реакции электрофильного присоединения

С целью объединения фотохимических свойств ароматических азидов и псораленов был синтезирован ряд 5-азидо-8-алкоксипсораленов и изучена их способность к фотомодификации НК. При облучении азидопсораленов УФ-светом (351 нм) в ацетонитриле образуются триплетный нитрен и азациклопентадиен, а в воде — только триплетный нитрен. Реакционной способности этих частиц для эффективной фотомодификации ДНК не хватает. Псорален, являясь триплетным сенситизатором, способствует образованию триплетного нитрена. Такое неблагоприятное влияние псораленового остатка на фотохимию азидогруппы является причиной того, что ДНК pBR322 не расщепляется 5-азидо-8-алкоксипсораленами при УФ-облучении.<sup>65</sup>

Олигонуклеотидные реагенты, содержащие ароматические азидогруппы, также были не очень эффективны при фотомодификации НК вследствие протекания многочисленных побочных реакций. В случае ароматических азидов реакция идет не через высокореакционноспособный синглетный нитрен **31**, а через значительно менее реакционноспособный азациклопентадиен **32**, образующийся из нитрена **31** в ходе быстрого внутримолекулярного расширения цикла. Помимо этого нитро-, циано-, формил-, ацил- и особенно аминзамещенные ароматические азиды при облучении склонны к интеркомбинационной конверсии в более стабильный, но менее реакционноспособный триплетный нитрен **33**.<sup>52</sup> Нитрен **33** обычно либо расходует в реакциях радикальной димеризации с образованием азосоединений, либо восстанавливается до соответствующего анилина, не давая продуктов модификации НК (схема 3).

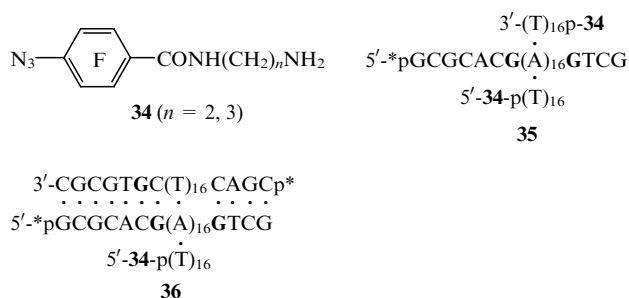
Перфторароматические азиды являются более перспективным классом фотореагентов, поскольку при их фотодиссоциации образуется в основном синглетный нитрен **31**.<sup>52, 66–68</sup> Наличие атомов фтора в *o*-положениях к азидогруппе снижает скорость образования азациклопентадиена в 1700 раз.<sup>66</sup> Кроме того, акцепторные атомы фтора увеличивают электрофильность синглетного нитрена в 10 раз,<sup>67</sup> реакционную способность триплетного нитрена и азациклопентадиена в 1000 и 10000 раз соответственно<sup>68</sup> по сравнению с нефторированными производными.

В работах<sup>46, 47</sup> изучено влияние строения арилазида на эффективность сайт-специфической фотомодификации ДНК, для чего была сопоставлена реакционная способность олигонуклеотидных производных 4-азидо-, 2-нитро-5-азидо- и



4-азидотетрафторбензамидами. При облучении УФ-светом они генерируют разные частицы — азациклопентадиен **32**, триплетный (**33**) и синглетный (**31**) нитрены соответственно; выход ковалентных аддуктов при сайт-специфической фотомодификации составил 5, 15 и 70%.<sup>67</sup> Реакционной способности частиц **32** и **33** недостаточно для модификации НК. Для олигонуклеотидного реагента с остатком перфторарилазида **34** на 5'-фосфате изучена позиционная направленность фотомодификации ДНК-мишеней, содержащих остатки Т, С, А или Г «напротив» фотореагента. Проведена обработка продуктов модификации пиперидином и показано, что степень модификации по этим остаткам равна ~50%; предельная степень модификации при этом составляет 40, 45, 45 и 65% соответственно.<sup>46, 47, 69</sup> При взаимодействии синглетного нитрена **31** с гетероциклическими атомами азота пиридинового типа происходит N-аминирование (схема 3). При фотомодификации оц-ДНК, вероятнее всего, протекает электрофильное присоединение по положению N(7) гуанина. Использование двух комплементарных соседних участкам ДНК-мишени олигонуклеотидных реагентов, содержащих в месте соприкосновения два остатка перфторарилазида **34**, позволило увеличить выход ковалентных аддуктов фотомодификации до 80%.<sup>70</sup>

Осуществлена высокоэффективная сайт-специфическая фотомодификация 27-членных фрагментов оц- и дц-ДНК 4-азидотетрафторбензамидным производным p(T)<sub>16</sub>.<sup>71, 72</sup>



Фотомодификация оц-ДНК в триплексе **35** в основном протекала по основаниям G7 и G24 (выделены жирным шрифтом); выход ковалентных аддуктов достигал 77%. Основными точками фотомодификации дц-ДНК в триплексе **36** были остатки G7 А-богатой и G22 Т-богатой цепи (выходы ковалентных аддуктов 37 и 16% соответственно). После пиперидинового расщепления суммарная степень модификации в триплексе **36** увеличивалась до 50% в А-богатой и до 42% в Т-богатой цепи за счет нековалентной модификации по пиримидиновым основаниям.<sup>71, 72</sup>



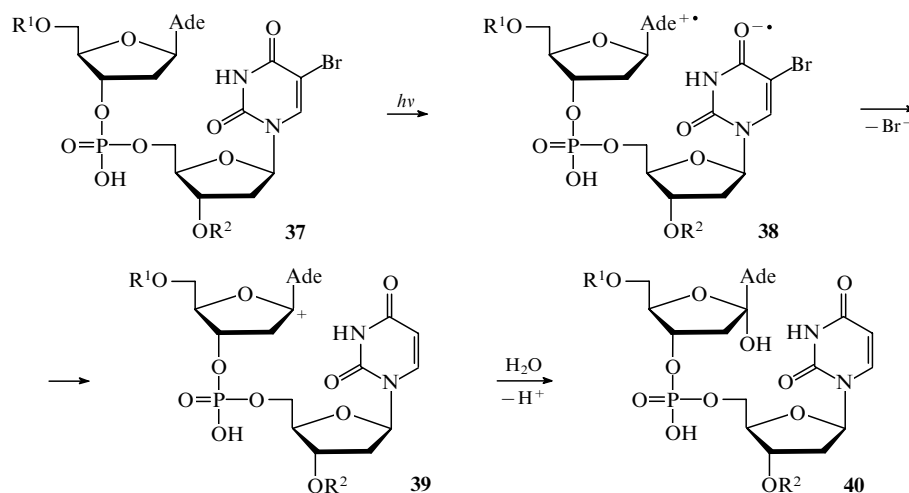
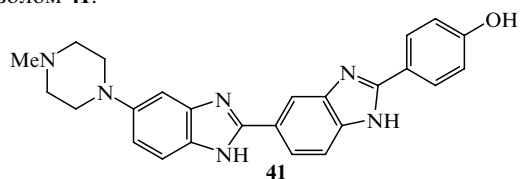


Схема 4

Для олигонуклеотидов **37**, содержащих последовательности  $5'\text{-A}^{\text{Br}}\text{U}$ , детально изучен механизм образования одноцепочечных разрывов, инициированных фотолизом галогенированных пиримидинов (схема 4).<sup>23, 81, 82</sup> При облучении УФ-светом (302 нм) происходит фотоиндуцированный перенос электрона с аденина на возбужденное триплетное состояние бромуридина  $^3(\text{BrU})^*$  с образованием катион-радикала аденина  $\text{Ade}^{++}$  и анион-радикала уридина (соединение **38**). Далее от анион-радикала отщепляется  $\text{Br}^-$ , полученный 5-урацильный радикал способен отрывать атом водорода от ближайшего атома C(1') с образованием карбокатиона **39**.<sup>81</sup> Присоединение воды по атому C(1') карбокатиона **39** приводит к 1'-гидроксипроизводному **40**. В результате апуринизации соединения **40** и протекания последующих реакций происходит расщепление цепи ДНК. Строение стабильных продуктов расщепления ДНК рассмотрено в обзоре.<sup>81</sup> Аналогичные реакции протекают и в самокомплементарных дуплексах типа  $5'\text{-d}(\text{GCA}^{\text{Br}}\text{UGC})_2$ , содержащих последовательности  $5'\text{-A}^{\text{Br}}\text{U}$ .<sup>83</sup>

Облучение (313 нм) ДНК, содержащих звенья  $5\text{-d}^1\text{U}$ , приводит к щелочезависимому одноцепочечному расщеплению с эффективностью 0.5, механизм которого несколько иной.<sup>84</sup> Фотореакция протекает через гомолитическое расщепление связи C(5)—I уридина. Образовавшийся 5-урацильный радикал конкурентно отрывает атомы водорода от атомов C(1') или C(2') дезоксирибозы, находящейся с 5'-стороны от него.<sup>81</sup> Эффективность аналогичного расщепления при облучении УФ-светом с  $\lambda = 365$  нм в присутствии бисбензоимидазола Хехст 33258 **41** увеличивается до 0.9. В этих условиях начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации в 4–5 раз больше, чем скорость фотомодификации в отсутствие бисбензоимидазола. Соединение **41** связывается в малой бороздке ДНК, интенсивно поглощает УФ-свет (365 нм,  $23000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$ ) и возбуждается. Перенос электрона с бисбензоимидазола **41** на  $5\text{-d}^1\text{U}$  вызывает отщепление аниона  $\text{I}^-$  и образование урацильного радикала, реакции которого и вызывают фотомодификацию ДНК.<sup>84</sup> Аналогичные результаты были получены для фоторасщепления ДНК, содержащих звенья  $5\text{-d}^{\text{Br}}\text{U}$ , сенсibilизированного к длинноволновому УФ-свету бисбензоимидазолом **41**.<sup>85</sup>



Считается, что бисбензоимидазольные красители предпочтительнее связываются с  $(\text{AT})_4$ - и  $(\text{AT})_3\text{A}(5\text{-}^{\text{Br}}\text{U})$ -последо-

вательностями ДНК<sup>86</sup> и за счет этого обеспечивают высокую эффективность переноса электрона на ближайшие остатки галогенированных пиримидинов.

При выращивании клеток на среде, содержащей  $5\text{-d}^{\text{Br}}\text{U}$ , наблюдается включение в ДНК одного остатка  $5\text{-d}^{\text{Br}}\text{U}$  на  $\sim 200$  нуклеотидов. Облучение клеток УФ-светом (365 нм) в присутствии бисбензоимидазола **41** вызывает образование белково-нуклеиновых сшивок, одно- и двухцепочечных разрывов ДНК, модификацию оснований.<sup>87, 88</sup> Это приводит к многочисленным абберациям хромосом и гибели клеток. Гибель клеток при облучении в присутствии фотореагента  $5\text{-d}^{\text{Br}}\text{U}$  и сенсibilизатора **41** протекает в 30000 раз эффективнее, чем при облучении нативных клеток УФ-светом и в 20 раз эффективнее, чем при облучении  $5\text{-d}^{\text{Br}}\text{U}$ -содержащих клеток в отсутствие сенсibilизатора.<sup>87</sup>

Использование двухкомпонентных систем сенсibilизатор–фотореагент позволяет совместить высокую реакционную способность фотореагента и спектрально-люминесцентные свойства сенсibilизатора.

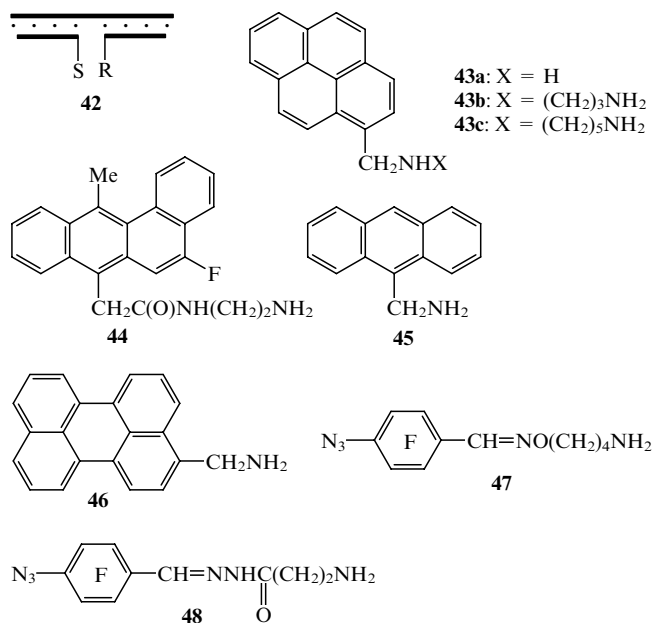
## 2. Сенсibilизированная фотомодификация ДНК бинарными системами олигонуклеотидных реагентов

Для большинства фотореакционноспособных производных поглощение света и темновые реакции протекают в комплементарном комплексе с ДНК-мишенью и в растворе с одинаковой скоростью. В лучшем случае это приводит к непродуктивному расходу фотореагента в растворе, а чаще всего инициирует нежелательные побочные реакции.

Вместе с тем олигонуклеотидные производные обладают недостаточной для модификации нуклеиновых кислот *in vivo* специфичностью, так как в физиологических условиях (37°C) стабильные комплексы формируются при длине олигонуклеотидов 12–13 оснований. Олигонуклеотиды, имеющие длину 18–20 оснований, необходимую для высокоспецифического распознавания уникальных нуклеотидных последовательностей в составе ДНК, способны образовывать многочисленные несовершенные комплексы с неполностью комплементарными последовательностями.<sup>89</sup>

Чтобы преодолеть описанные выше недостатки, было предложено разделить процессы поглощения света и фотомодификации. Для этого были получены бинарные системы олигонуклеотидных конъюгатов **42**, комплементарных соседним участкам ДНК-мишени и содержащих химически инертные группы — сенсibilизатор (S) и фотореагент (R). Сближенные в составе комплементарного комплекса группы S и R образуют фотореакционноспособный центр, который может быть активирован облучением длинноволновым УФ- или видимым светом за счет безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения с сенсibilизатора на

фотореагент. Возбужденный таким образом фотореагент вызывает фотомодификацию только той ДНК-мишени, которая находится в составе комплементарного комплекса.<sup>90–100</sup> Длина обоих нуклеотидов-адресов выбрана такой (оба адреса — декануклеотиды), чтобы температура плавления дуплексов была  $\sim 37^\circ\text{C}$ : они не способны в физиологических условиях образовывать несовершенные дуплексы с неполностью комплементарными последовательностями.<sup>89</sup>



В качестве сенсibilизаторов были использованы производные пиренил-1-метиламина (**43a–c**),<sup>89, 94–96</sup> *N*-(5-фтор-12-метилбензо[*a*]антрацен-7-илацетил)этилендиамин (**44**),<sup>90–93</sup> антрацен-9-илметиламин (**45**)<sup>98</sup> и перифторароматические азиды: *n*-азидотетрафторбензамиды **34**,<sup>94, 95</sup> *O*-(4-аминобутил)-*n*-азидотетрафторбензальдоксим (**47**),<sup>96</sup> *N*-(4-азидотетрафторбензилиден)-*N'*-(3-аминопропионил)гидразин (**48**).<sup>89–93, 101, 102</sup>

Описано несколько механизмов сенсibilизации — синглет-синглетный перенос энергии с фотовозбужденного сенсibilизатора на фотореагент,<sup>89–94, 98</sup> двухквантовый триплет-триплетный перенос энергии<sup>95, 96</sup> и фотоиндуцированный перенос электрона с фотореагента на возбужденный сенсibilизатор.<sup>97, 99, 101, 102</sup>

#### а. Синглет-синглетный перенос энергии

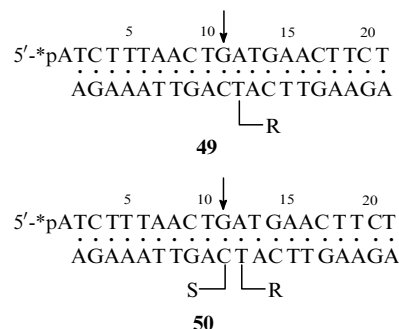
Для осуществления синглет-синглетного переноса энергии необходимо, чтобы энергия 0,0-перехода между самыми нижними колебательными уровнями основного и первого возбужденного электронных состояний в молекуле сенсibilизатора была больше энергии соответствующего перехода в молекуле фотореагента R и чтобы спектр испускания возбужденного сенсibilизатора ( $S^*$ ) перекрывался со спектром поглощения реагента R.<sup>103</sup>

Энергия 0,0-перехода в ароматических азидах составляет  $\sim 70$  ккал·моль<sup>–1</sup> и их малоинтенсивное пл\*-поглощение наблюдается в области до 450 нм.<sup>104</sup> Производные полиароматических углеводородов — пирена **43**, бензоантрацена **44** и антрацена **45** — имеют высокие квантовые выходы флуоресценции и малые стоксовы сдвиги (т.е. минимальные потери энергии при фотовозбуждении и последующей флуоресценции). Энергия 0,0-переходов в незамещенных пирене, бензоантрацене и антрацене составляет соответственно 76,<sup>104</sup> 72<sup>105</sup> и 73 ккал·моль<sup>–1</sup> (см.<sup>104</sup>) и больше, чем энергия 0,0-переходов в азидах **34**, **47** и **48**. Таким образом, спектры

флуоресценции соединений **43–45** перекрываются со спектрами поглощения этих азидов.<sup>91</sup>

Эффективность переноса энергии сильно зависит от расстояния между сенсibilизатором и фотореагентом и при обычно используемых микромолярных концентрациях олигонуклеотидных производных переноса энергии с сенсibilизатора на фотореагент в растворе не наблюдается.

При облучении УФ-светом (365–390 нм) комплексов оц-ДНК с олигонуклеотидным конъюгатом, содержащим реагент, в отсутствие (комплекс **49**) и в присутствии (комплекс **50**) сенсibilизатора образуются ковалентные аддукты. В качестве фотореагента R использовали азид **34**, а в качестве сенсibilизатора S — производные пирена **43a–c**. Обработка продуктов реакции пиперидином показала, что прямая (в комплексе **49**) и сенсibilизированная (в комплексе **50**) фотомодификация протекает по остатку G11.<sup>89</sup>



Начальная скорость и эффективность прямой (в комплексе **49**) и сенсibilизированной (в комплексе **50**) фотомодификации мишени зависела от расположения фотореагента и сенсibilизатора на 3'- или 5'-фосфатах и от длины линкера между сенсibilизатором и олигонуклеотидом-адресом. Более эффективными оказались олигонуклеотидные производные с фотореагентом на 3'-фосфате, выход ковалентных аддуктов в этом случае достигал 70%. Скорость сенсibilизированной к УФ-свету (365–390 нм) фотомодификации в 100–1500 раз больше скорости прямой комплементарно адресованной модификации и снижается при увеличении длины линкера в ряду пиренильных производных **43a–c**.<sup>94</sup>

Проведена фотомодификация комплексов оц-ДНК **49** и **50** олигонуклеотидным производным азиды **48**. При эквимольном соотношении конъюгатов и мишени предельные выходы ковалентных аддуктов прямой фотомодификации в

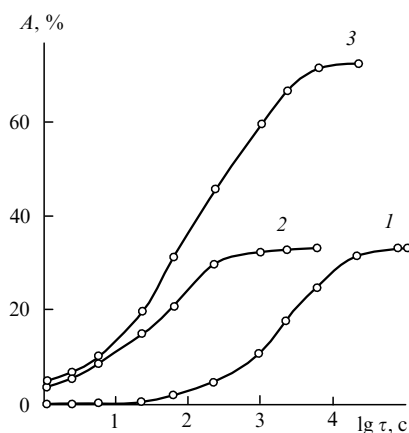
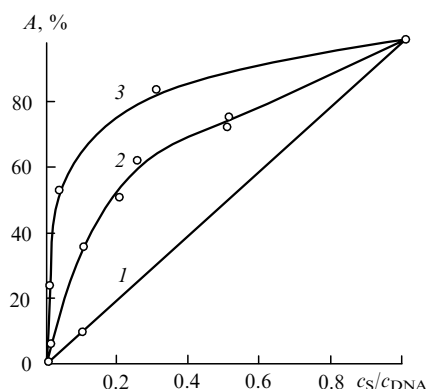


Рис. 2. Выход (*A*) ковалентных аддуктов присоединения олигонуклеотидного конъюгата, содержащего остаток азиды **48**, к комплементарной ДНК-мишени при облучении УФ-светом (365–390 нм) комплексов **49** (*1*) и **50** (*2*, *3*); концентрации, мкмоль·л<sup>–1</sup>: олигонуклеотидных конъюгатов — 50 (*1–3*), ДНК-мишени — 50 (*1*, *2*), 1 (*3*).



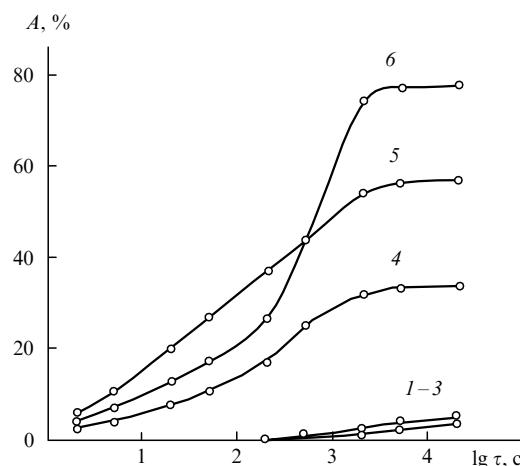
**Рис. 3.** Зависимость относительного выхода ( $A$ ) ковалентных аддуктов сенсibilизированной фотомодификации в комплексе **50** от соотношения концентраций сенсibilизатора ( $c_s$ ) и ДНК-мишени ( $c_{DNA}$ ) при облучении УФ-светом (365–390 нм). За 100% принят выход аддуктов при эквимольном соотношении реагентов. Концентрации ДНК-мишени и олигонуклеотидного фотореагента 50 мкмоль  $\cdot$  л $^{-1}$ . Облучение проводили: 1 — 10 мин при 4°C; 2 — 90 мин при 42°C; 3 — 300 мин при 42°C.

комплексе **49** (рис. 2, кривая 1) и сенсibilизированной олигонуклеотидным производным бензоантрацена **44** фотомодификации в комплексе **50** (рис. 2, кривая 2) одинаковы (~30%), но начальная скорость сенсibilизированной реакции в 120 раз больше скорости прямой. Ускорение фотомодификации происходит за счет эффективного переноса энергии с фотовозбужденного сенсibilизатора  $S^*$  на фотореагент  $R$ . При 50-кратном избытке олигонуклеотидных конъюгатов (кривая 3) начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации практически не меняется по сравнению со скоростью сенсibilизированной модификации при эквимольном соотношении реагентов (кривая 2), однако при этом наблюдается увеличение выхода ковалентных аддуктов до 72%. Выход продуктов прямой фотомодификации в этих условиях возрастает незначительно.<sup>90,93</sup>

Для объяснения полученных данных была изучена зависимость выхода ковалентных аддуктов при недостатке сенсibilизатора и избытке фотореагента от соотношения концентраций сенсibilизатора и ДНК-мишени (рис. 3). В отсутствие каталитического эффекта сенсibilизатора она должна быть линейной. Это наблюдается при облучении в условиях (10 мин, 4°C), когда обмена компонентов комплекса **50** с раствором не происходит (прямая 1). При увеличении времени облучения и повышении температуры каждая молекула сенсibilизатора способна инициировать модификацию нескольких молекул мишени (кривые 2 и 3). Так, при 100-кратном недостатке сенсibilизатора (облучение при 42°C) каждая его молекула вызывает фотомодификацию до 24 молекул мишени.<sup>93</sup>

В работах<sup>91,92</sup> была проведена оценка специфичности прямой и сенсibilизированной фотомодификации природной ДНК-мишени. Для этого ферментативным гидролизом была получена смесь из 18 фрагментов оц-ДНК M13BMR4. Один из фрагментов длиной ~150 оснований содержал последовательность-мишень, комплементарную (как в комплексах **49** и **50**) олигонуклеотидам-адресам, остальные фрагменты такой последовательности не содержали. Данные по прямой и сенсibilизированной фотомодификации смеси рестриков ДНК олигонуклеотидным конъюгатом с остатком азида **48** на меченном изотопом  $^{32}P$  5'-фосфате представлены на рис. 4.

Избыток некомплементарных ДНК-фрагментов практически не влияет на  $\gamma_{эф}$  сенсibilизированной модификации (кривая 6) по сравнению с модификацией в модельном комплексе **50**. Эффективность прямой фотомодификации



**Рис. 4.** Выход ковалентных аддуктов ( $A$ ) при фотомодификации смеси рестриков оц-ДНК M13BMR4 в комплексах **49** (1–3) и **50** (4–6) при облучении видимым светом (400–480 нм) в зависимости от температуры, °C: 1, 4 — 4; 2, 5 — 20; 3, 6 — 37.

смеси рестриков заметно снижена (кривые 1–3) по сравнению с  $\gamma_{эф}$  в комплексе **49**, по-видимому, за счет конкурентной реакции с частично комплементарными последовательностями различных фрагментов ДНК M13. Эффективность и скорость прямой фотомодификации слабо зависят от температуры (кривые 1–3). В случае сенсibilизированной фотомодификации ее эффективность при увеличении температуры с 4 до 37°C резко возрастает (кривые 4–6); при этом начальная скорость реакции сначала увеличивается (кривые 4, 5), а при достижении температуры плавления комплекса снижается в 2 раза (кривая 6).

Такая температурная зависимость обусловлена способностью одноцепочечного фрагмента образовывать шпильки рядом с местом модификации, и при низких температурах последовательность-мишень становится малодоступной для олигонуклеотидных конъюгатов. При увеличении температуры структурированные участки оц-ДНК расплетаются, доступность последовательности-мишени возрастает и эффективность сенсibilизированной фотомодификации увеличивается.

При 37°C начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации на 4 порядка выше (кривая 6), а степень модификации в 60 раз больше, чем в случае прямой реакции (кривая 1). При той же температуре уровень неспецифической модификации по фрагментам ДНК M13, не содержащим комплементарной вставки, для сенсibilизированной реакции в ~1.5 раза меньше, чем для прямой.<sup>92</sup> Показано, что селективность сенсibilизированной фотомодификации, определенная как отношение  $\gamma_{эф}$  специфической и неспецифической модификаций, в 90 раз выше, чем прямой реакции.<sup>91,92</sup>

Модификации подвергаются преимущественно остатки G, величина  $PZ$  зависит от их числа в  $(pG)_n$ -последовательности ДНК-мишени в месте модификации. Выход ковалентных аддуктов прямой модификации при  $n = 1, 2$  и 4 составлял 33–41, 68–72 и 82–85% соответственно, а сенсibilизированной — 62–68,<sup>89,98</sup> 75–82<sup>94,98</sup> и 98–99%<sup>98</sup> соответственно.

Проведена фотомодификация ДНК мишени 5'-рАТ-GGATTCTTGAAGGGGACCGCATT бинарной системой конъюгатов, комплементарных подчеркнутым участкам и содержащих остатки антрацена **45** и азида **48**. Данные, полученные при расщеплении продуктов пиперидином, показали, что фотомодификации преимущественно подвергаются остатки G15 и G16 и в меньшей степени — остатки G14 и G17.<sup>98</sup> Это позволило уточнить строение комплекса бинарной системы олигонуклеотидных конъюгатов с ДНК-мишенью (данные двумерного ЯМР  $^1H$ ).<sup>100</sup> Вероятность нахождения перфторарилазидного остатка в контакте с

основаниями G14–G17 ДНК-мишени составила G14:G15:G16:G17 = 12:40:40:8.<sup>98</sup>

### б. Фотоиндуцированный перенос электрона

В предыдущем разделе показано, что использование бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов увеличивает начальную скорость сенсibilизированной фотомодификации оц-ДНК в 100–10000 раз по сравнению со скоростью прямой фотомодификации и увеличивает эффективность специфической реакции почти на два порядка. Но сенсibilизация за счет синглет-синглетного переноса энергии не позволяет полностью предотвратить неспецифическую модификацию, что особенно заметно при модификации длинных (7500 и более оснований) последовательностей. Протекание неспецифических реакций обусловлено следующим: конъюгат, содержащий фотореагент, связывается с теми комплементарными последовательностями ДНК-мишени, которые не имеют рядом последовательностей, комплементарных конъюгату, содержащему сенсibilизатор.<sup>90</sup>

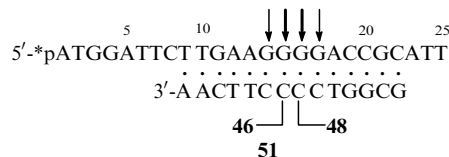
Чтобы предотвратить неспецифическую модификацию при образовании несовершенных комплексов, каждая из групп фотореакционного центра по отдельности должна быть в условиях облучения неактивной.

С этой целью авторы работ<sup>97,99</sup> получили активируемую видимым светом (440–580 нм) бинарную систему олигонуклеотидных производных сенсibilизатора **46** и фотореагента **48**, комплементарных соседним участкам ДНК-мишени в комплексе **50**.

В качестве сенсibilизатора было выбрано производное перилена **46**, энергия возбуждения ( $E_{0,0}$ ) которого меньше ( $64 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ ),<sup>104</sup> чем энергия 0,0-перехода в ароматических азидах, но который способен сенсibilизировать их фоторазложение за счет фотоиндуцированного переноса электрона с азидогруппы на фотовозбужденный сенсibilизатор.<sup>104</sup>

На рис. 5 представлены данные по прямой фотомодификации при облучении видимым светом (420–580 нм) ДНК-мишени в комплексе **49** (кривая 1) и фотомодификации в комплексе **50**, сенсibilизированной олигонуклеотидными производными бензантрацена **44** (кривая 2) и перилена **46** (кривая 3). Начальная скорость фотомодификации, сенсibilизированной производным перилена, примерно в 300000 раз

больше, а сенсibilизированной производным бензантрацена — примерно в 10 раз больше, чем прямой фотомодификации. При облучении комплекса **49** УФ-светом (365–390 нм) с выходом ~30% образуются аддукты, расщепляющиеся пиперидином по остатку гуанозина G14 ДНК-мишени (указано стрелкой). Иницированная видимым светом фотомодификация в комплексе **50**, сенсibilизированная конъюгатом перилена **46**, приводит с выходом ~70% к ковалентным аддуктам, расщепляющимся по тому же остатку гуанозина. Вероятнее всего, она обусловлена переносом электрона с неподеленной электронной пары атома азота в азидогруппе фотореагента на фотовозбужденный перилен.<sup>97,104</sup> В результате этого из остатка перилена образуется анион-радикал, который быстро окисляется кислородом воздуха до соответствующего 1,12-периленхинона.<sup>97</sup> Одновременно из перфторарилазида образуется катион-радикал, который в ходе последующих темновых превращений вызывает такую же фотомодификацию ДНК, как и в случае синглетного нитрена.



Сенсibilизированная фотомодификация (450–580 нм, 15 мин) ДНК-последовательности из промоторного участка гена множественной лекарственной устойчивости (MDR-1), содержащей четыре остатка G в области фотореакционного центра, бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов (комплекс **51**) протекает почти количественно.<sup>101,102</sup> Обработка пиперидином продуктов реакции показала, что в основном модифицируются остатки G15, G16 и в меньшей степени остатки G14, G17. В отсутствие сенсibilизатора фотомодификация не идет.

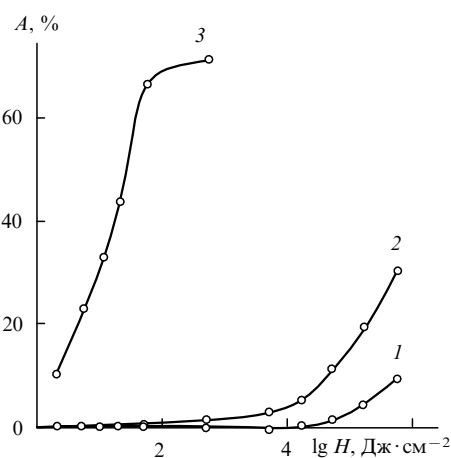
Таким образом, бинарные системы олигонуклеотидных реагентов, содержащих остатки перилена **46** и перфторарилазида **48**, позволяют провести количественную фотомодификацию ДНК-мишени при облучении видимым светом в синезеленом диапазоне (450–580 нм) в условиях, когда оба компонента этой системы по отдельности практически не активны.

## IV. Двухквантовая фотосенсibilизированная модификация ДНК

Основные реагенты фотоокисления нуклеиновых кислот — радикал  $\cdot\text{OH}$  и синглетный  $^1\text{O}_2$  — обладают высокой токсичностью. Вследствие этого было предложено использовать фотореагенты, не образующие диффундирующих активных частиц. Химическая активность фотореагентов может быть достигнута двухквантовым возбуждением более высоких электронных состояний.<sup>106,107</sup> Развитие пикосекундной лазерной техники сделало реальным проведение многоквантовых реакций. Для двухквантового возбуждения возможны два различных механизма: резонансное двухквантовое и нерезонансное двухфотонное возбуждение.

Первый из них заключается в последовательном ступенчатом поглощении двух фотонов через реальное промежуточное состояние поглощающих частиц. Оно заселяется при поглощении первого кванта и является стартовой точкой для поглощения второго кванта. Реальное возбужденное состояние имеет определенное время жизни, обычно  $10^{-4} - 10^{-9}$  с. Фотохимическая модификация ДНК может осуществляться как с высших синглетных, так и с триплетных возбужденных состояний.<sup>15,106,108</sup>

Второй механизм — нерезонансное двухквантовое возбуждение, в котором не участвует никакое реальное промежуточное состояние. В этом случае второй фотон должен



**Рис. 5.** Выход ковалентных аддуктов фотомодификации ДНК в комплексах **49** (1) и **50** (2, 3) при облучении видимым светом в зависимости от экспозиции ( $H$ ). Концентрация ДНК-мишени  $1 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ , олигонуклеотидных конъюгатов —  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ . Облучение проводили в диапазоне, нм: 420–580 (1), 450–580 (2, 3). В качестве сенсibilизатора использовали олигонуклеотидный конъюгат, содержащий остаток бензоантрацена **44** (2) или перилена **46** (3).

быть поглощен во время поглощения первого, т.е. за время  $\sim 10^{-15}$  с. Для двухквантового, особенно нерезонансного, возбуждения необходимы высокие интенсивности света ( $I \geq 3 \cdot 10^{14}$  Вт·м $^{-2}$ ).<sup>108</sup>

Важной особенностью двухквантовых механизмов возбуждения является суммирование энергии квантов света для инициирования фотохимической реакции. Другая особенность двухквантовых реакций — соответствие спектроскопическим правилам отбора. При наличии в молекуле фотосенсибилизатора центра симметрии поглощение каждого кванта меняет четность волновой функции. Следовательно, двухквантовое возбуждение может приводить к реакционноспособным состояниям, появление которых запрещено при одноквантовом возбуждении.<sup>108, 109</sup>

## 1. Двухквантовое нерезонансное возбуждение

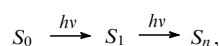
Двухквантовое возбуждение может обеспечить успешное применение известных фотореагентов в практических целях, так как позволяет инициировать фотохимические реакции облучением красным и ИК-светом вместо УФ- и фиолетового света. ИК-излучение (750–1000 нм) глубоко проникает в ткани, не поглощается компонентами клетки и не вызывает их повреждения. Вследствие этого специфичность воздействия может быть значительно увеличена.<sup>108</sup>

Псоралены являются одним из наиболее перспективных классов фотореагентов, но их спектральная светочувствительность была ограничена диапазоном 320–436 нм.<sup>108, 110</sup> В последнее время достигнуты значительные успехи в преодолении этого недостатка. При облучении 8-метокси-, 4'-амино-4,5,8-триметил-<sup>108</sup> и 4'-гидроксиметил-4,5',8-триметилпсораленов<sup>110</sup> титано-сапфировым лазером (730 нм) наблюдалось нерезонансное двухквантовое возбуждение и антистоксова флуоресценция при 452 нм, интенсивность которой имела квадратичную зависимость от пиковой мощности лазера.<sup>108</sup> При этом инициировались те же фотохимические реакции, что и при одноквантовой активации псораленов УФ-светом (365 нм).

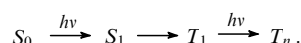
Фотобиологические свойства псоралена при двухквантовом возбуждении проверены *in vivo* по инаktivации бактериального His-оперона в *S. typhimurium*. Короткоимпульсное ( $\tau \sim 0.2$  нс), высокоинтенсивное лазерное облучение ( $I = 3 \cdot 10^{14}$  Вт·м $^{-2}$ ) в отсутствие псоралена обладало низкой мутагенностью, в присутствии псоралена облучение лазером (730 нм) полностью подавляло экспрессию His-оперона вследствие образования ковалентных бисаддуктов псоралена с дц-ДНК.<sup>108</sup>

## 2. Двухквантовое резонансное возбуждение

Двухквантовое резонансное возбуждение заключается в последовательном поглощении двух квантов света. При этом достигается как образование высших возбужденных синглетных состояний ( $S_n$ )



так и высших возбужденных триплетных состояний ( $T_n$ )



### а. Двухквантовое резонансное синглет-синглетное возбуждение

При фотовозбуждении в первую очередь образуются синглетные состояния  $S_n$ . Они обладают большей энергией, но на несколько порядков меньшим временем жизни, чем соответствующие триплетные состояния. Так, время жизни состояния  $S_n$  менее  $10^{-11}$  с, время жизни  $S_1$ -состояния, как правило,  $10^{-8}$  с. Подходящие условия для бимолекулярных

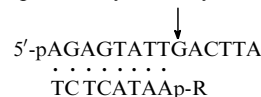
реакций из состояний  $S_n$  достигаются в том случае, когда сенсибилизатор образует с молекулой-мишенью донорно-акцепторный комплекс в основном состоянии или эксиплекс в возбужденном.<sup>111</sup>

Для реализации этого механизма фотореагенты должны иметь низкий выход интеркомбинационной конверсии (ISC) в триплетное состояние и подходящие  $S_1 \rightarrow S_n$ -переходы. Этим требованиям удовлетворяют некоторые полиметиновые красители ( $\phi_{ISC} \leq 0.03$ ), тетраазапорфирины ( $\phi_{ISC} \leq 0.15$ ),  $Mg^{2+}$ - и  $Zn^{2+}$ -фталотионины ( $MPC^{2+}$ ,  $M = Mg, Zn$ ) ( $\phi_{ISC} \leq 0.06$ ) и др.<sup>106, 112</sup>

Нелинейное поглощение  $MgPC^{2+}$  ( $\epsilon_{681} = 2.2 \cdot 10^5$ ,  $\phi_R = 0.6$ ,  $\tau_R = 5$  нс) наблюдалось при импульсном ( $\tau = 1.6$  нс) лазерном возбуждении (680 нм) с плотностью импульса  $> 10^{24}$  Эйнштейн·см $^{-2}$ ·с $^{-1}$ . Выход двухквантово-возбужденных молекул достигал  $\sim 100\%$  при плотности импульса  $10^{27}$  Эйнштейн·см $^{-2}$ ·с $^{-1}$ . Спектр поглощения  $*MgPC^{2+}$  из  $S_1$ -состояния имеет длинноволновый максимум с  $\lambda = 710$  нм. При одновременном облучении  $MgPC^{2+}$  светом с двумя разными длинами волн ( $\lambda = 680$  и  $710$  нм) эффективно заселяется  $S_n$ -состояние, время жизни которого  $\tau \sim 15$  пс. Этого недостаточно для протекания бимолекулярных реакций, но достаточно для фотоиндуцированного переноса электрона, который происходит за 0.3 пс.<sup>106</sup>

Была изучена лазер-индуцированная двухквантовая фотомодификация ДНК, сенсибилизированная разными интеркалирующими красителями. Наиболее эффективным среди них оказался бромистый этидий.<sup>113–115</sup>

Проведена сайт-специфическая двухквантовая фотомодификация оц- и дц-ДНК олигонуклеотидными конъюгатами этидиевых производных **20** и **21**. При облучении азотным лазером (337 нм,  $I = 150$  Вт·м $^{-2}$ ) происходило ступенчатое двухквантовое возбуждение интеркалированного в ДНК хромофора с последующей модификацией мишени. Энергии двух квантов было достаточно для инициирования различных видов фотомодификации, включая разрывы фосфодиэфирных связей.<sup>113, 114</sup> Сфокусированное лазерное облучение дуплекса



приводило к спонтанному расщеплению мишени по остатку G9 (выход  $\sim 10\%$ ) и образованию ковалентных аддуктов (выход 20–40%).

Для эффективности спонтанного расщепления ДНК-мишени наблюдалась квадратичная зависимость от плотности мощности облучения. После пиперидинового расщепления суммарная степень модификации ДНК-мишени возрастала за счет скрытой модификации и достигала 90%. Расфокусированное лазерное облучение ( $2$  Вт·м $^{-2}$ ) дуплекса приводило только к ковалентным аддуктам (выход 40%).<sup>114</sup>

Механизм двухквантового расщепления до конца не выяснен. Но было показано, что добавление химических ловушек радикалов и  $^1O_2$  не приводит к заметному снижению эффективности спонтанного расщепления. Большинство разрывов находится на расстоянии не более чем одно основание от этидиевого остатка. Следовательно, радиус миграции двухквантового возбуждения по цепи ДНК не превышает 4–5 Å.<sup>113, 114</sup>

Присоединение этидия **20** к гептануклеотиду 5'-ACAAACCP увеличивало температуру плавления дуплекса с комплементарным октануклеотидом 5'-pTGTTTGGC с 23 до 50°C. При облучении дуплекса азотным лазером (337 нм,  $\tau = 8$  нс,  $I = 1200$  Вт·м $^{-2}$ , 4 ч) до полного фоторазложения этидиевого остатка в случае конъюгата 5'-ACAAACCP-**20** образуются ковалентные аддукты (выход 40%). Их обработка пиперидином вызывала расщепление по остаткам G6 и G7 и увеличивала степень повреждения мишени до 65% за счет скрытой моди-

фикации.<sup>50</sup> При облучении дуплекса октануклеотида 5'-pTGTGGG с конъюгатом 5'-ACAAACCp-**21** образуется 55% ковалентных аддуктов и 5% продуктов прямого расщепления. При обработке пиперидином расщепление протекает по тем же остаткам (G6 и G7) с общим выходом 70%.

Облучение триплекса дц-ДНК с 5'-(TC)<sub>6</sub>T-производным этидия **20** приводит к прямому расщеплению (выход 10%) полипуриновой цепи по остаткам G(-1), A(0), A(1) и G(2) по отношению к положению этидия в триплексе. При этом не наблюдалось заметной фотомодификации полипиримидиновой цепи.<sup>50</sup>

Характер наблюдаемых повреждений и заметная специфичность фотомодификации к электронодонорным пуриновым основаниям согласуется со следующим механизмом. При наносекундной длительности лазерного импульса триплетное состояние не успевает образоваться, поэтому происходит двухквантовое возбуждение в  $S_n$ -состояние и ионизация с образованием катион-радикала этидия и свободного электрона. Катион-радикал этидия отрывает электрон от пуриновых оснований ДНК или атомы водорода от дезоксирибозы. Квантовый выход фоторасщепления ДНК, сенсibilизированного бромистым этидием, очень мал ( $\phi = 5 \cdot 10^{-8}$ ) вследствие обратного переноса электрона, однако в присутствии метилвиологена — химической ловушки электронов — он увеличивается на порядок.<sup>116</sup>

#### 6. Двухквантовое резонансное триплет-триплетное возбуждение

Бинарные системы олигонуклеотидных реагентов открывают широкие возможности использования различных механизмов двухквантовой сенсibilизации для сайт-специфической фотомодификации ДНК. Проведена сенсibilизированная фотомодификация при одновременном облучении УФ- и видимым светом в диапазоне 365–580 нм комплекса ДНК-мишени с бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов **50**, содержащих остатки пирена **43a** и азида **34**. При этом происходит шестикратное увеличение скорости модификации и изменение ее позиционной направленности с остатка гуанина G11 на остаток тимина T13 по сравнению с облучением в диапазоне 365–390 нм.<sup>95</sup> Предположено, что в этих условиях возможно протекание двухквантовой триплет-триплетной сенсibilизации азида **34** пиреном **43a** (механизм показан на рис. 6).

Пирен обладает достаточно высоким квантовым выходом интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ( $\phi_{ISC} = 0.37$ ),<sup>117</sup> но энергия триплетного уровня пирена ( $E(T_1) = 48.7 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ )<sup>118</sup> намного ниже, чем энергия триплетного уровня ароматических азидов ( $E(T_1) \approx 68 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ ).<sup>104</sup> Следовательно, одноквантовая триплетная сенсibilизация азида **34** пиреном невозможна.

В то же время пирен обладает интенсивным триплет-триплетным поглощением в видимой области. Время жизни триплетного состояния ( $T_1$ ) достаточно велико ( $\tau \approx 0.5 \text{ с}$ ), и

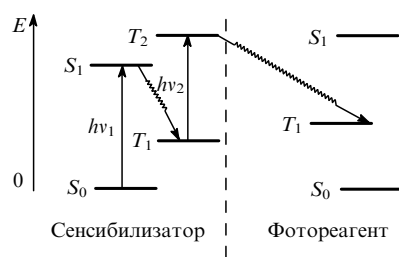


Рис. 6. Диаграмма расположения основных и возбужденных состояний пирена **43a** и перфторарилазиды **34**.

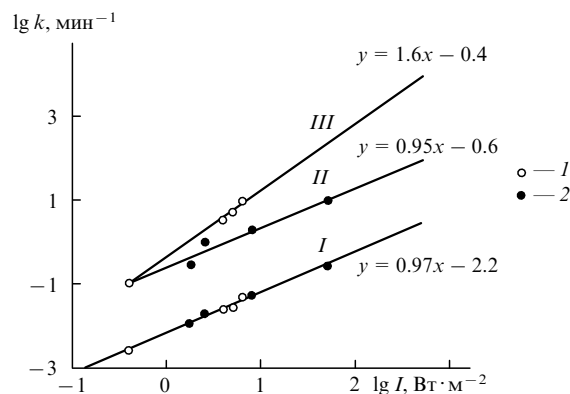
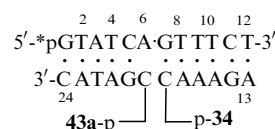


Рис. 7. Зависимость константы начальной скорости прямой (I) и сенсibilизированной (II, III) фотомодификации ДНК от потока мощности света в диапазоне облучения, нм: 365–440 (I), 365–390 (2).

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. 6). Энергия возбужденного триплетного уровня пирена ( $E(T_2) = 77.8 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$ )<sup>118</sup> намного больше, чем энергия триплетного уровня азиды **34**. Вследствие этого двухквантовый триплет-триплетный перенос энергии с сенсibilизатора на  $T_1$ -уровень фотореагента термодинамически разрешен и должен протекать с диффузионно-контролируемой скоростью. Далее возбужденный за счет триплет-триплетного переноса энергии азид **34** диссоциирует на азот и триплетный нитрен **33**. Последний фотомодифицирует ДНК-мишень с образованием характерных для этой бирадикальной частицы продуктов.

На рис. 7 в логарифмических координатах приведены зависимости начальных скоростей накопления ковалентных аддуктов в комплексах **49** и **50** от потока мощности света при облучении в различных диапазонах длин волн. В этих координатах тангенс угла наклона прямой соответствует порядку реакции по свету. Видно, что при всех условиях облучения тангенс угла наклона для прямой фотомодификации близок к единице (прямая I). Тангенс угла наклона для сенсibilизированной фотомодификации при облучении УФ-светом (365–390 нм) также близок к единице (прямая II), в то время как при одновременном облучении УФ- и видимым светом (365–580 нм) он равен 1.6 (прямая III). Это доказывает, что в таких условиях облучения помимо одноквантовых процессов фотомодификации ДНК протекают и двухквантовые.

Критическое расстояние, на которое осуществляется двухквантовый триплет-триплетный перенос энергии, обычно равно 5–6 Å, что в 2–3 раза меньше, чем расстояние, необходимое для одноквантового триплет-триплетного переноса, и в 4–10 раз меньше, чем необходимое для синглет-синглетного переноса энергии.<sup>119</sup> Протекание двухквантового процесса сенсibilизации в комплементарном комплексе **50** позволяет предположить, что остатки сенсibilизатора и фотореагента имеют возможность сближаться на расстояние до 6 Å по крайней мере в момент поглощения квантов света. Для подтверждения этого методом 2D-ЯМР была изучена структура комплекса бинарной системы с ДНК-мишенью.



Остаток пирена **43a** стабилизирует комплекс, повышая температуру плавления на 7°C за счет гидрофобных взаимо-

действий с гетероциклическими основаниями. Он располагается со стороны малой бороздки и взаимодействует с остатками Т4—С5—А6—G7 ДНК-мишени. Фотореагент располагается со стороны большой бороздки около остатка G7. Расстояние между центрами остатков пирена и азида составляет 8–9 Å. Такое сближение сенсibilизатора и фотореагента способствует высокоэффективному переносу.<sup>100</sup> Облучение дуплекса приводит к фотомодификации мишени по остатку G7.

Таким образом, представленные результаты показывают высокую перспективность двухквантовых методов фотомодификации НК, поскольку они позволяют использовать более длинноволновый свет и регулировать реакционную способность фотореагентов при изменении условий облучения.

## V. Перспективы использования фотореагентов для направленной модификации нуклеиновых кислот *in vivo*

Механизмы фотосенсибилизированных реакций модификации и расщепления нуклеиновых кислот большинством фотореагентов, рассмотренных в данном обзоре, до конца не выяснены. Более четкое представление об этих механизмах может быть чрезвычайно полезным для разработки новых, значительно более эффективных реагентов, способных на прямую эффективно расщеплять фосфодиэфирные связи.

Наиболее существенным преимуществом олигонуклеотидных конъюгатов псораленов и перфторарилазидов как фотореагентов является высокая специфичность фотомодификации. Помимо наличия адреса, это обусловлено отсутствием диффундирующих реакционноспособных частиц и селективностью к определенным гетероциклическим основаниям: остаткам Т и U в случае псораленов и остаткам G в случае перфторарилазидов.

Сенсибилизированная фотомодификация НК бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов удачно сочетает в себе преимущества физической (каталитический эффект сенсibilизатора) и химической сенсибилизации (отсутствие свободно диффундирующих реакционноспособных частиц). Другим преимуществом данного подхода является то, что фотореакционноспособный центр формируется из двух инертных составляющих только после независимого узнавания протяженной последовательности ДНК-мишени двумя олигонуклеотидами-адресами.

Двухквантовая сенсибилизация обладает рядом преимуществ в плане создания эффективных подходов к направленной воздействию на нуклеиновые кислоты *in vivo*. Возбуждение реагентов двумя квантами длинноволнового света позволяет резко увеличить специфичность сенсибилизированной фотомодификации ДНК-мишени за счет подавления побочных одноквантовых реакций, а изменение позиционной направленности фотомодификации при двухквантовой сенсибилизации по сравнению с одноквантовой может быть полезным при изучении сложных биологических комплексов.

Нерезонансное двухквантовое возбуждение дает возможность инициировать фотохимические реакции красным и ИК-светом, но вряд ли позволит значительно увеличить специфичность фотомодификации. При таких высоких пиковых мощностях будут двухквантово возбуждаться все компоненты клетки, поглощающие в УФ-диапазоне на удвоенной частоте. В этом смысле более перспективным является резонансное двухквантовое возбуждение при двух разных длинах волн. При этом, помимо фотосенсибилизатора, будут возбуждаться только те соединения, которые обладают близким с ним поглощением и в основном, и в возбужденном состоянии, а вероятность этого достаточно мала.

Проанализированные в данном обзоре результаты позволяют предположить, что для селективной фотомодификации нуклеиновых кислот *in vivo* наиболее перспективным может быть использование бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов в сочетании с двухквантовыми методами возбуждения.

Обзор написан при частичной финансовой поддержке программы «Ведущие научные школы» (грант № 96-15-97732).

## Литература

1. С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая. *Успехи химии*, **67**, 274 (1998)
2. C.Helene, J.-J.Toulme. *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 99 (1990)
3. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, A.V.Lebedev, O.S.Fedorova. *Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994
4. E.Braun, Y.Eichen, U.Sivan, G.Ben-Yoseph. *Nature (London)*, **391**, 775 (1998)
5. H.P.Spielmann, P.A.Fagan, T.M.Bregant, R.D.Little, D.E.Wemmer. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 1576 (1995)
6. R.Kuroda, H.Satoh, M.Shinomiya, T.Watanabe, M.Otsuka. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 1524 (1995)
7. A.S.Boutorine, D.Braut, M.Takasugi, O.Delgado, C.Helene. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9469 (1996)
8. V.V.Vlassov. *The Lock and Key Principle*. (Ed. J.-P.Behr). Wiley, New York, 1994. P. 89
9. B.Armitage, T.Koch, H.Frydenlund, H.Orum, H.-G.Batz, G.B.Schuster. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 4674 (1997)
10. D.S.Sigman, A.Mazumder, D.M.Perrin. *Chem. Rev.*, **93**, 2295 (1993)
11. I.Saito, M.Takayama, H.Sugiyama, T.Nakamura. *NATO ASI Ser.*, **479**, 163 (1996)
12. Д.Г.Кнопpe. *Биоорг. химия*, **23**, 3 (1997)
13. D.S.Sigman. *Biochemistry*, **29**, 9098 (1990)
14. G.Laustriat. *Biochimie*, **68**, 771 (1986)
15. R.P.Wayne. *Principles and Applications of Photochemistry*. Oxford University Press, Oxford; New York; Tokio, 1988
16. J.Cadet, M.Berger, C.Decarroz, J.R.Wagner, J.E.Van Lier, Y.M.Ginot, P.Vigny. *Biochimie*, **68**, 813 (1986)
17. R.V.Bensasson, E.J.Land, E.J.Truscott. *Flash Photolysis and Pulse Radiolysis. Contributions to the Chemistry of Biology and Medicine*. Pergamon Press, Oxford; New York; Toronto, 1983
18. Н.К.Кочетков, Э.И.Будовский, Е.Д.Свердлов, Н.А.Симуква, М.Ф.Турчинский, В.Н.Шибяев. *Органическая химия нуклеиновых кислот*. Химия, Москва, 1970. С. 615
19. D.N.Nikogosyan. *Laser Picosecond Spectroscopy and Photochemistry of Biomolecules*. (Ed. V.S.Letokhov). Hilger, Bristol, 1987. P. 212
20. H.Gorner, M.Wala, D.Schulte-Frohlinde. *Photochem. Photobiol.*, **55**, 173 (1992)
21. D.Magda, R.A.Miller, M.Wright, J.Rao, J.L.Sessler, B.L.Iverson, P.I.Sansom. *NATO ASI Ser.*, **479**, 337 (1996)
22. Д.Г.Кнопpe, О.С.Федорова, Е.И.Фролова. *Успехи химии*, **62**, 65 (1993)
23. J.C.Quada Jr, M.J.Levy, S.M.Hecht. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 12171 (1993)
24. I.H.Holdberg. *Acc. Chem. Res.*, **24**, 191 (1991)
25. D.A.Dunn, V.H.Lin, I.E.Kochavar. *Biochemistry*, **31**, 16620 (1992)
26. D.B.Hall, J.K.Barton. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 5045 (1997)
27. K.Nakatani, J.Shirai, S.Sando, I.Saito. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7626 (1997)
28. B.L.Lee, K.R.Blake, P.S.Miller. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 10681 (1988)
29. E.J.Gunter, P.A.Havre, F.P.Gasparro, P.M.Glazer. *Photochem. Photobiol.*, **63**, 207 (1996)
30. C.Giovannangeli, N.T.Thuong, C.Helene. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4275 (1992)
31. F.P.Gasparro, P.A.Havre, G.A.Olack, E.J.Gunther, P.M.Glazer. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2845 (1994)
32. P.A.Havre, E.J.Gunther, F.P.Gasparro, P.M.Glazer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7879 (1993)
33. P.A.Havre, P.M.Glazer. *J. Virol.*, **67**, 7324 (1993)

34. M.Grignoriev, D.Praseuth, A.L.Guieysse, P.Robin, N.T.Thuong, C.Helene, A.Harel-Bellan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3501 (1993)
35. J.A.Hartley, S.R.McAdam, S.Das, M.C.Roldan, M.K.Haskell, M.Lee. *Anti-Cancer Drug Des.*, **9**, 181 (1994)
36. K.E.Rao, G.Gosselen, D.Mrani, C.Perigaut, J.L.Imbach, C.Bailly, J.P.Henichart, P.Colson, C.Houssier, J.W.Lown. *Anti-Cancer Drug Des.*, **9**, 221 (1994)
37. C.Bailly, J.B.Chaires. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 513 (1998)
38. G.Delons, J.-P.Clarenc, B.Lebled, J.-P.Leonetti. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16933 (1994)
39. K.M.Meisenheimer, T.H.Koch. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 101 (1997)
40. A.Favre, C.Saintome, J.-L.Fourrey, P.Clivio, P.Laugaa. *J. Photochem. Photobiol., B Biol.*, **42**, 109 (1998)
41. P.Laugaa, A.Woisard, J.-L.Fourrey, A.Favre. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Life Sci.*, **318**, 307 (1995)
42. H.W.Pley, K.M.Flaherty, D.B.McKay. *Nature (London)*, **372**, 68 (1994)
43. A.Woisard, J.-L.Fourrey, A.Favre. *J. Mol. Biol.*, **239**, 366 (1994)
44. W.G.Scoott, J.B.Murray, J.Arnold, B.L.Stoddard, A.Klug. *Science*, **274**, 2065 (1996)
45. C.Bravo, F.Lescure, P.Laugaa, J.-L.Fourrey, A.Favre. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 1351 (1996)
46. М.И.Добриков, В.Ф.Зарытова, Н.И.Комарова, А.С.Левина, С.А.Лохов, Т.А.Приходько, Г.В.Шишкин, Д.Р.Табатадзе, М.М.Заалишвили. *Биоорг. химия*, **18**, 540 (1992)
47. A.S.Levina, D.R.Tabatadze, M.I.Dobrikov, G.V.Shishkin, L.M.Khalimskaya, V.F.Zarytova. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **6**, 119 (1996)
48. J.-F.Wang, W.D.Downs, T.R.Cech. *Science*, **260**, 504 (1993)
49. J.-F.Wang, T.R.Cech. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4178 (1994)
50. A.A.Koshkin, K.Yu.Kropachev, S.V.Mamaev, N.V.Bulychev, S.G.Lokhov, V.V.Vlassov, A.V.Lebedev. *J. Mol. Recognit.*, **7**, 177 (1994)
51. N.P.Gritsan, A.A.Koshkin, A.Yu.Denisov, Yu.Ya.Markushin, E.V.Cherepanova, A.V.Lebedev. *J. Photochem. Photobiol., B Biol.*, **37**, 40 (1997)
52. J.Brunner. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 483 (1993)
53. U.Henriksen, C.Larsen, G.Karup, C.Jeppesen, P.E.Nielsen, O.Buchardt. *Photochem. Photobiol.*, **53**, 299 (1991)
54. M.Chatterjee, S.E.Rokita. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6397 (1990)
55. M.Chatterjee, S.E.Rokita. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5116 (1991)
56. M.Chatterjee, S.E.Rokita. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1690 (1994)
57. Y.Chiang, A.J.Kresge, B.Hellrung, P.Schunemann, J.Wirz. *Helv. Chim. Acta*, **80**, 1106 (1997)
58. I.Saito, M.Takayama, T.Sakurai. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2653 (1994)
59. J.M.Kelly, M.M.Feeney, L.Jacquet, A.K.-D.Mesmaeker, J.-P.Lecomte. *Pure Appl. Chem.*, **69**, 767 (1997)
60. A.K.-D.Mesmaeker, I.Ortmans, O.V.Gijte, W.Bannwarth. In *The 30th International Conference on Coordination Chemistry. (Abstracts of Reports)*. Kyoto, 1994. P. 68
61. C.Mousheron, A.K.-D.Mesmaeker, J.M.Kelly. *J. Photochem. Photobiol., B Biol.*, **40**, 91 (1997)
62. C.J.Murphy, M.R.Arkin, Y.Jenkins, N.D.Ghatlia, H.S.Bossmann, N.J.Turro, J.K.Barton. *Science*, **262**, 1025 (1993)
63. D.B.Hall, R.E.Holmlin, J.K.Barton. *Nature (London)*, **382**, 731 (1996)
64. K.Nakatani, J.Shirai, R.Tamaki, I.Saito. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 5363 (1995)
65. T.Chen, J.Michalak, M.S.Platz. *Photochem. Photobiol.*, **61**, 600 (1995)
66. R.Poe, K.Schnapp, M.J.T.Young, J.Grayzar, M.S.Platz. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5054 (1992)
67. G.B.Schuster, M.S.Platz. *Adv. Photochem.*, **17**, 69 (1992)
68. K.A.Schnapp, R.Poe, E.Leyva, N.Soundararajan, M.S.Platz. *Bioconjugate Chem.*, **4**, 172 (1993)
69. М.И.Добриков, В.Н.Горн, В.Ф.Зарытова, А.С.Левина, Т.А.Приходько, Г.В.Шишкин, Д.Р.Табатадзе, М.М.Заалишвили. *Биоорг. химия*, **18**, 1190 (1992)
70. А.С.Левина, Д.Р.Табатадзе, В.Ф.Зарытова, М.И.Добриков, В.Н.Горн, Л.М.Халимская. *Биоорг. химия*, **20**, 21 (1994)
71. А.С.Левина, Д.Р.Табатадзе, В.Ф.Зарытова, М.И.Добриков, В.Н.Горн, С.А.Лохов. *Биоорг. химия*, **20**, 30 (1994)
72. A.S.Levina, D.R.Tabatadze, M.I.Dobrikov, G.V.Shishkin, V.F.Zarytova. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **6**, 127 (1996)
73. М.И.Добриков, Р.Ю.Дудко, А.С.Левина, Л.М.Халимская, Г.В.Шишкин. *Биоорг. химия*, **22**, 200 (1996)
74. A.S.Levina, M.V.Berezovsky, A.G.Venjaminova, M.I.Dobrikov, M.N.Repkova, V.F.Zarytova. *Biochimie*, **75**, 25 (1993)
75. K.N.Bulygin, D.M.Graifer, M.N.Repkova, I.A.Smolenskaya, A.G.Veniaminova, G.G.Karpova. *RNA*, **3**, 1480 (1997)
76. А.В.Казанцев, Г.А.Максакова, О.С.Федорова. *Биоорг. химия*, **21**, 767 (1995)
77. В.В.Коваль, Г.А.Максакова, О.С.Федорова. *Биоорг. химия*, **23**, 266 (1997)
78. S.V.Doronin, M.I.Dobrikov, M.Buckle, P.Roux, H.Buc, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **354**, 200 (1994)
79. М.И.Добриков, С.В.Доронин, И.В.Сафронов, Г.В.Шишкин. *Химия в интересах устойчивого развития*, **2**, 605 (1994)
80. M.I.Dobrikov, S.V.Doronin, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **313**, 31 (1992)
81. G.Pratviel, J.Bernadou, B.Meunier. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 746 (1995)
82. H.Sugiyama, Y.Tsutsumi, K.Fujimoto, I.Saito. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4443 (1993)
83. H.Sugiyama, Y.Tsutsumi, I.Saito. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6720 (1990)
84. R.O.Rahn, H.G.Sellin. *Photochem. Photobiol.*, **55**, 309 (1992)
85. B.S.Rosenstein, R.B.Setlow, F.E.Ahmed. *Photochem. Photobiol.*, **31**, 215 (1980)
86. T.Hard, P.Fan, D.R.Kearns. *Photochem. Photobiol.*, **51**, 77 (1990)
87. C.L.Limoli, J.P.Day, J.F.Ward, W.F.Morgan. *Photochem. Photobiol.*, **67**, 233 (1998)
88. C.L.Limoli, J.F.Ward. *Radiat. Res.*, **138**, 312 (1994)
89. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, А.А.Кошкин, Н.П.Лукьянчук, Г.В.Шишкин, В.В.Власов. *Докл. АН*, **344**, 122 (1995)
90. V.V.Vlassov, M.I.Dobrikov, S.A.Gaidamakov, E.K.Gaidamakova, T.I.Gainutdinov, A.A.Koshkin. *NATO ASI Ser.*, **479**, 195 (1996)
91. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, А.А.Кошкин, Г.В.Шишкин, В.В.Власов. *Докл. АН*, **351**, 547 (1996)
92. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, А.А.Кошкин, В.В.Власов. *Докл. АН*, **351**, 687 (1996)
93. M.I.Dobrikov, S.A.Gaidamakov, E.K.Gaidamakova, T.I.Gainutdinov, A.A.Koshkin, V.V.Vlassov. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **7**, 309 (1997)
94. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, А.А.Кошкин, Т.И.Гайнутдинов, Н.П.Лукьянчук, Г.В.Шишкин, В.В.Власов. *Биоорг. химия*, **23**, 191 (1997)
95. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, А.А.Кошкин, Т.И.Гайнутдинов, Н.П.Лукьянчук, Г.В.Шишкин, В.В.Власов. *Биоорг. химия*, **23**, 553 (1997)
96. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, Г.В.Шишкин, В.В.Власов. *Биоорг. химия*, **24**, 831 (1998)
97. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, Т.И.Гайнутдинов, Е.Д.Тенетова, Г.В.Шишкин, В.В.Власов. *Биоорг. химия*, **25**, 31 (1999)
98. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, Т.И.Гайнутдинов, Т.М.Иванова, В.В.Власов. *Биоорг. химия*, **25**, 137 (1999)
99. М.И.Добриков, С.А.Гайдамаков, Т.И.Гайнутдинов, Е.Д.Тенетова, Г.В.Шишкин, В.В.Власов. *Докл. АН*, **358**, 403 (1998)
100. E.V.Bichenkova, D.S.Marks, S.G.Lokhov, M.I.Dobrikov, V.V.Vlassov, K.T.Douglas. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **15**, 307 (1997)
101. M.I.Dobrikov, T.I.Gainutdinov, V.V.Vlassov. In *The XIIIth International Round Table "Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications"*. (Abstracts of Reports). Montpellier, 1998. P. 332
102. M.I.Dobrikov, T.I.Gainutdinov, V.V.Vlassov. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1517 (1999)
103. М.Я.Мельников, В.А.Смирнов. *Фотохимия органических радикалов*. Изд-во МГУ, Москва, 1994. С. 90
104. L.J.Leyshon, A.Reiser. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **11**, 1918 (1972)

105. H.A.Sharifian, C.-H.Puin, F.-B.Jiang, S.-M.Perk. *J. Photochem.*, **30**, 229 (1985)
106. K.Teuchner, A.Pfarrherr, H.Stiel, W.Freyer, D.Leupold. *Photochem. Photobiol.*, **57**, 465 (1993)
107. D.Leupold, W.Freyer. *J. Photochem. Photobiol., B Biol.*, **12**, 311 (1992)
108. W.G.Fisher, W.P.J.Partridge Jr., C.Dees, E.A.Wachter. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 141 (1997)
109. C.R.Lambert, H.Stiel, D.Leupold, M.C.Lynch, I.E.Kochevar. *Photochem. Photobiol.*, **63**, 154 (1996)
110. D.H.Oh, R.J.Stanley, M.Lin, W.K.Hoeffler, S.G.Boxer, M.W.Berns, E.A.Bauer. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 91 (1997)
111. Г.О.Беккер, А.В.Ельцов. *Введение в фотохимию органических соединений*. Химия, Ленинград, 1976
112. D.Leupold, I.E.Kochevar. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 562 (1997)
113. Н.В.Булычев. Дис. д-ра хим. наук. НИБХ СО РАН, Новосибирск, 1991
114. Л.З.Бенимetskая, Н.В.Булычев, А.Л.Козионов, А.А.Кошкин, А.А.Лебедев, С.Ю.Новожилов, М.И.Штокман. *Биоорг. химия*, **14**, 48 (1988)
115. L.Z.Benimetskaya, N.V.Bulychev, A.L.Kozionov, A.V.Lebedev, S.Yu.Novozhilov, M.I.Stockmann. *Biopolymers*, **28**, 1129 (1989)
116. Z.Shaquiri, E.Keskinova, A.Spasky, D.Angelov. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 517 (1997)
117. F.Wilkinson. *Organic Molecular Photophysics. Vol. 2.* (Eds J.B.Birks, J.London). Wiley, New York, 1975. P. 95
118. H.Labhart, W.Heinzermann. *Organic Molecular Photophysics. Vol. 1.* (Eds J.B.Birks, J.London). Wiley, New York, 1973. P. 297
119. В.Л.Ермолаев, Е.Н.Бодунов, Е.Б.Свешникова, Т.А.Шахвердов. *Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения*. Наука, Ленинград, 1977. С. 94

#### SITE-SPECIFIC SENSITISED PHOTOMODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY BIRADICAL AND ELECTROPHILIC REAGENTS

**M. I. Dobrikov**

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences  
8, Ul. Acad. Lavrentieva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)233–3676*

Photosensitised oxygen-independent reactions of chemical modification of nucleic acids including free radical cycloaddition and electrophilic addition (photodynamic effect of the III type) are presented. The attention is focussed on the site-specific photomodification. New approaches to the highly specific affinity modification of nucleic acids — the sensitised photomodification by photoreagent–sensitiser binary systems and two photon photosensitised reactions — are described. The prospects for the application of electrophilic photoreagents for photosensitised modification of nucleic acids *in vivo* are discussed. Bibliography — 119 references.

*Received 13th April 1999*